

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506542

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月30日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 35/76		A 6 1 K 35/76	
48/00		48/00	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 17/00	
7/00		5/00	B
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求(全 55 頁)
(21) 出願番号 特願平9-506376		(71) 出願人 トランジェーヌ、ソシエテ、アノニム	
(86) 出願日 平成8年(1996) 7月24日		フランス国ストラスブール、リュ、ド、モ	
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 3月24日		ルシャイム、11	
(86) 国際出願番号 PCT/FR 96/01165		(72) 発明者 メターリ、マジド	
(87) 国際公開番号 WO 97/04119		フランス国イルキルシュエーグラフェンスタ	
(87) 国際公開日 平成9年(1997) 2月6日		ーデン、アンバス、ド、レム、16	
(31) 優先権主張番号 95/08946		(72) 発明者 ルスキー、モニカ	
(32) 優先日 1995年7月24日		ドイツ連邦共和国フライブルク、カッペレ	
(33) 優先権主張国 フランス (FR)		ンウェーク、18	
(31) 優先権主張番号 96/04413		(72) 発明者 リットナー、カロラ	
(32) 優先日 1996年4月9日		フランス国ストラスブール、リュ、デ、シ	
(33) 優先権主張国 フランス (FR)		ゴーニュ、4	
		(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)	
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 遺伝子治療用ウイルスベクターおよび系統

(57) 【要約】

発現が相補細胞で機能性だが宿主細胞で機能性でないようにウイルス遺伝子の発現が調節された新規ウイルスベクターと、その新規ベクターを含んだウイルス粒子および宿主細胞が開示されている。ウイルス遺伝子発現リプレッサーを含んだ相補細胞と、感染性ウイルス粒子の作製方法も開示されている。最後に、上記ベクターを含有した医薬組成物とその治療用途が開示されている。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

1. 1以上のウイルス遺伝子を有した発現単位を含むウイルスベクターであつて、その発現単位が相補細胞で機能性だが、宿主細胞で機能性でなく、かつ1以上の異種レギュレーター配列を含んでなる、ウイルスベクター。
2. 発現単位がインデューサーの存在下でウイルス遺伝子の発現を活性化することおよび／またはリプレッサーの存在下でウイルス遺伝子の発現を阻害することができる1以上の調節配列を含んでなる、請求項1に記載のウイルスベクター。
3. 調節配列が転写、伸長、輸送、メッセンジャーRNAの安定性または翻訳のレベルで作用できる、請求項1または2に記載のウイルスベクター。
4. 調節配列が発現単位のプロモーターのレベル、更に特にTATAボックスの上流におかれている、請求項3に記載のウイルスベクター。
5. 発現単位が、TAR、RRE、GRE、PRE、EREおよびGal4 UAS配列、並びにメタロチオネイン遺伝子の調節配列、および細菌トリプトファンラクトースおよびテトラサイクリンオペロンの調節配列から選択される1以上の調節配列を含んでなる、請求項1～4のいずれか一項に記載のウイルスベクター。
6. 発現単位が、テトラサイクリントランスアクチベーター(tTA)タイプのインデューサーにより活性化され、かつテトラサイクリンにより抑制されるプロモーターを与えるために、プロモーターのTATAボックスの上流におかれた、テトラサイクリンオペロンに由来する1以上の調節配列を含んでなる、請求項5に記載のウイルスベクター。
7. 発現単位が、テトラサイクリンリプレッサー(tetR)により抑制されるプロモーターを与えるために、プロモーターのTATAボックスの下流におかれた、テトラサイクリンオペロンに由来する1以上の調節配列を含んでなる、請求項5に記載のウイルスベクター。
8. ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、AAV(アデノ関連ウイルス)、ポックスウイルスおよびアデノウイルスから選択されるウイルスに由来する、請求項1～7のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

9. ヒト、イヌ、トリ、ウシ、ネズミ、ヒツジ、ブタまたはサル起源のアデノウイルス、あるいは異なる起源のアデノウイルスゲノム断片を含んだハイブリッドに由来する、請求項8に記載のアデノウイルスベクター。

10. 複製に欠陥がある、請求項8または9に記載のウイルスベクター。

11. 少なくともE1領域の全部または一部と、場合によりE3領域の全部または一部を欠いている、請求項10に記載のアデノウイルスベクター。

12. E2、E4またはL1-L5領域の1以上のウイルス遺伝子を有した1以上の発現単位を含んでなる、請求項9~11のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。

13. リーディングフレームの発現がテトラサイクリントランスアクトベーター (tTA) タイプのインデューサーにより活性化されてテトラサイクリンにより抑制されるように、プロモーターのTATAボックスとE4領域のオープンリーディングフレーム (ORF) 6および7の上流におかれた、テトラサイクリンオペロンに由来する1以上の調節配列を有した発現単位を含んでなる、請求項12に記載のアデノウイルスベクター。

14. 宿主細胞で発現に必要な要素のコントロール下におかれた外来ヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1~13のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

15. 外来ヌクレオチド配列がサイトカイン、細胞または核レセプター、リガンド、凝固因子、CFTRタンパク質、インシュリン、ジストロフィン、成長ホルモン、酵素、酵素阻害剤、抗腫瘍効果を有したポリペプチド、細菌、寄生虫

またはウイルス、特にHIV感染、を阻止できるポリペプチド、抗体、毒素、免疫毒素およびマーカーをコードする遺伝子から選択される、請求項14に記載のウイルスベクター。

16. 請求項1~15のいずれか一項に記載されたウイルスベクターを含んでなる、感染性ウイルス粒子。

17. 請求項1~15のいずれか一項に記載されたウイルスベクターまたは請求項16に記載された感染性ウイルス粒子を含んでなる真核宿主細胞。

18. インデューサーおよび/またはリプレッサーを含んでなる相補細胞。

19. インデューサーおよび/またはリプレッサーをコードするDNA断片を含んでなる、請求項18に記載の相補細胞。

20. 293系に由来する、請求項18または19に記載の相補細胞。

21. E1機能と少なくとも1つの第二の後期または初期アデノウイルス機能に欠陥があるアデノウイルスベクターの相補用細胞であって、

(i) 相補細胞で発現に必要な要素のコントロール下におかれた、アデノウイルスのE1領域の全部または一部の発現のための第一カセット、および

(ii) 相補細胞で発現に必要な要素のコントロール下におかれた、E1領域以外のアデノウイルスの後期または初期領域の全部または一部の発現のための第二カセット（上記要素は請求項5～7のいずれか一項に記載された1以上の調節配列を含んでいる）

を含んでなる、請求項18～20のいずれか一項に記載の相補細胞。

22. 第二発現カセットの要素が1～20のtetO配列を5'末端に伴う最小プロモーターを含んでなる、請求項21に記載の相補細胞。

23. 第二発現カセットの要素が7つのtetO配列を5'末端に伴うCMVウイルス（サイトメガロウイルス）由来の最小プロモーターを含んでなる、請求項22に記載の相補細胞。

24. E1およびE4機能に欠陥があるアデノウイルスベクターの相補用細胞であって、第二発現カセットがアデノウイルスのE4領域の全部または一部の発現用カセットである、請求項18～23のいずれか一項に記載の相補細胞。

25. 第二発現カセットがアデノウイルスのE4領域のオープンリーディングフレーム6および7（ORF6/7）をコードする配列の発現用カセットである、請求項24に記載の相補細胞。

26. E1およびE2機能に欠陥があるアデノウイルスベクターの相補用細胞であって、第二発現カセットがアデノウイルスのE2領域の全部または一部の発現用カセットである、請求項18～23のいずれか一項に記載の相補細胞。

27. 第二発現カセットがアデノウイルスのE2領域のDBPタンパク質（

DNA結合タンパク質)をコードする配列の発現用カセットである、請求項26に記載の相補細胞。

28. 第二発現カセットがアデノウイルスのE2領域のDBPタンパク質の温度感受性変異体をコードする配列の発現用カセットである、請求項26に記載の相補細胞。

29. E1機能と少なくとも2つの他の後期または初期アデノウイルス機能に欠陥があるアデノウイルスベクターの相補用細胞であって、相補細胞で発現に必要な要素、好ましくは請求項5、6または7に記載されたプロモーターのコントロール下におかれた、E1領域と第二発現カセットのアデノウイルス領域以外のアデノウイルスの後期または初期領域の全部または一部の発現のための第三カセットを更に含んでなる、請求項18~28のいずれか一項に記載の相補細胞。

30. E1、E2およびE4機能に欠陥があるアデノウイルスベクターの相補用であって、

(i) 相補細胞で発現に必要な要素のコントロール下におかれた、アデノウイルスのE1領域の全部または一部の発現のための第一カセット、

(ii) 相補細胞で発現に必要な要素のコントロール下におかれた、アデノウイルスのE4領域の全部または一部の発現のための第二カセット、および

(iii) 相補細胞で発現に必要な要素のコントロール下におかれた、アデノウイルスのE2領域の全部または一部の発現のための第三カセット

を含み、第二および/または第三発現カセットの上記要素が少なくとも1つのtetO配列を伴うプロモーター、更に特に7つのtetO配列を5'末端に伴うCMVウイルス(サイトメガロウイルス)由来の最小プロモーターを含んでなる、請求項29に記載の相補細胞。

31. 相補細胞により産生されるウイルス粒子の力価が $5 \times 10^8$  pfu (プラーク形成単位)/ml以上である、請求項18~30のいずれか一項に記載の相補細胞。

32. 相補細胞により産生されるウイルス粒子の力価が $1 \times 10^{10}$  i.f.u. (感染単位)/ml以上である、請求項18~31のいずれか一項に記載の相補細胞。

胞。

33. (i) 請求項1～15のいずれか一項に記載されたウイルスベクターが、トランスフェクトされた相補細胞を得るために、in transで上記ウイルスベクターを相補することができる相補細胞中に導入され、

(ii) 上記トランスフェクトされた相補細胞がウイルス遺伝子の発現と上記感染性ウイルス粒子の産生を行うために適切な条件下で培養され、および

(iii) 上記感染性ウイルス粒子が細胞培養物中で回収されることを含む、請求項16に記載された感染性ウイルス粒子の作製方法。

34. ウイルスベクターがアデノウイルスベクターであり、相補細胞が請求項20に記載されたものである、請求項33に記載の方法。

35. (i) アデノウイルスベクターが、感染相補細胞を得るために、請求項21～32のいずれか一項に記載された相補細胞中に導入され、

(ii) 上記トランスフェクトされた相補細胞がウイルス遺伝子の発現と上記感染性ウイルス粒子の産生を行うために適切な条件下で培養され、および

(iii) 上記感染性ウイルス粒子が細胞培養物中で回収されることを含む、請求項34に記載の感染性アデノウイルス粒子の作製方法。

36. 請求項1～15のいずれか一項に記載されたウイルスベクター、請求項16に記載されたかまたは請求項33～35のいずれか一項に記載された作製方法を用いて得られた感染性ウイルス粒子、請求項17に記載された真核宿主細胞あるいは請求項18～32のいずれか一項に記載された相補細胞を、薬学的観点から許容されるビヒクルと組合せて含んでなる、医薬組成物。

37. 遺伝子治療によるヒトまたは動物体の治療用医薬品の製造における、請求項1～15のいずれか一項に記載されたウイルスベクター、請求項16に記載されたかまたは請求項33～35のいずれか一項に記載された作製方法を用いて得られた感染性ウイルス粒子、請求項17に記載された真核宿主細胞あるいは請求項18～32のいずれか一項に記載された相補細胞の治療または予防的使用。

38. リプレッサーと組み合わされた、請求項37に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 遺伝子治療用ウイルスベクターおよび系統

本発明は宿主細胞または生体で対象遺伝子のトランスファーおよび発現を行わせる新規ウイルスベクターに関し、そのウイルス遺伝子の発現は相補細胞で機能性だが宿主細胞または生体で機能性でないように調節されている。本発明は、これらの新規ベクターを含んだ細胞と、治療用の感染性ウイルス粒子を作製するための方法にも関する。本発明は、特にヒトにおける遺伝子治療の見通しに関して、極めて重要である。

遺伝子治療によりヒト疾患を治療する可能性は、数年で理論的考察の段階から臨床適用の段階へと変わってきた。ヒトに適用された最初のプロトコールは、アデニンデアミナーゼ（ADA）をコードする遺伝子に影響を与える変異の結果として遺伝的に免疫不全であった患者で、1990年9月に米国で開始された。この最初の実験で比較的うまくいったことが、様々な遺伝子または後天性疾患（感染疾患および特にエイズのようなウイルス疾患、またはがん）について新たな遺伝子治療プロトコールの開発を促した。これまでに記載された大多数のプロトコールでは、治療すべき細胞に治療遺伝子を移して、そこでそれを発現させるためにウイルスベクターを用いている。

現在までのところ、レトロウイルスベクターはそれらゲノムの単純さのために最も広く用いられているものの1つである。しかしながら、クローニングについてそれらの限定された能力とは別に、それらはそれらの系統的使用を制限する2つの大きな欠点を示す：一方でそれらは主として分裂細胞に感染し、他方で宿主細胞のゲノムでランダムなそれらの組込みの結果として、挿入変異誘発のリスクが無視できない。この理由から、多くの研究チームは他のタイプのベクターを開

発する努力をしており、その中ではアデノウイルス、アデノ関連ウイルス（AAV）、サイトメガロウイルス、ポックスウイルスおよびヘルペスウイルスに由来するものが挙げられる。一般的に言えば、それらの組織とそれらの感染サイクルは当業者に入手しうる文献で詳細に記載されている。

この関係において、アデノウイルスベクターの使用は有望な代替法であるとみ

られた。アデノウイルスは多くの動物種で証明され、広い宿主範囲を有し、ほとんど病原性を有さず、レトロウイルスに伴う欠点を示さないが、その理由はそれらが非組込み性であって、休止細胞でも複製されるからである。参考のために、それらのゲノムは約30以上の遺伝子、ウイルス複製に必要な初期遺伝子と後期構造遺伝子の双方を保有した約36kbの直鎖二本鎖DNA分子からなる(図1参照)。

初期遺伝子はアデノウイルスゲノムに広がる4つの領域に分けられる(E1-E4; Eは初期を表す)。それらは6つの転写単位を含み、それら自体のプロモーターを有している。後期遺伝子(L1-L5; Lは後期を表す)は初期転写単位と部分的に重複しており、ほとんどの部分について主要後期プロモーター(MLP)から転写される。

現在、遺伝子治療プロトコールで用いられるすべてのアデノウイルスベクターは、環境および宿主主体でそれらの拡散を避けるために、複製に不可欠なE1領域のほとんどを欠いている。それらの一部は、特にそれらのクローニング能力を増加させることができる非必須E3領域において、追加の欠失を含んでいる。対象遺伝子は、1つのまたは他の欠失領域に代わって、ウイルスDNA中に導入される。E1領域の欠失は、ウイルスゲノムを複製に欠陥のあるものにする。しかしながら、E1<sup>-</sup>ウイルスは、感染性ウイルス粒子を作るために、欠失ウイルス機

能をin transで供給する相補細胞系で増殖される。E1機能を効果的に補うヒト胚腎臓細胞から作られた293系(Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72)が常用されている。E3領域は必須でなく、補われる必要はない。

これら第一世代ベクターを用いた遺伝子トランスファーの実施可能性は現在ではうまく確立されているが、それらの安全性の問題は未解決のままである。安全面(RCA、即ち複製コンピテント粒子を作るリスク)とは別に、それらの毒性の問題が生じる。事実、最初の臨床試験では宿主でウイルス遺伝子の発現に伴い炎症反応の誘導を現した。

第二世代アデノウイルスベクターが最近文献で発表された。それらは感染細胞でウイルスの複製に必要なin cis領域(ITRおよびエンキャプシデーション配

列)を残して、in vivo 発現が望まれないウイルス遺伝子の大部分をなくす目的で実質的な内部欠失を有している。しかしながら、先行技術のこれらベクターは産業レベルでそれらの活用を制限するいくつかの欠点を有している。実際に、包括的な欠失機能を補って、高価でウイルス粒子を産生しうる新たな系統を思いどおりに有することが必要である。實際上、このような系統は、ウイルス粒子の増殖能力と収率に関して最良であるためには、アデノウイルス遺伝子の細胞毒性のために作るのが特に難しい。

本発明ではこれらの欠点を直すことができる。一方、慣用的第二世代アデノウイルスベクターの増幅のためにE1およびE2またはE4アデノウイルス機能を補う、293系に由来する新たな系統が構築されたが、その系統ではE2またはE4領域の発現がいわゆる細菌テトラサイクリンオペロンの、“オペレーター”配列を5'末端に伴うプロモーターにより指示され、これらの配列は以下でtetOと称される。対応発現産物の合成は、アデノウイルスベクターまたはその系統自体により産生されうるインデューサーの存在下だけで活性化される。同様に、リプレッサーは相補がもはや望まれないときに培地に加えられる。

他方、E1およびE3領域の大部分が失われた新規アデノウイルスベクターがここに作製され、そのベクターにおいて残存ウイルス領域(E2、E4および/

またはL1-L5)の転写単位は、感染性ウイルス粒子が作製されるときにはそれらの発現を行わせ、更にはそれを宿主細胞で阻害する目的で調節しうる。後の例において、調節はtetO配列により行われる。TATAボックスの5'側におけるそれらの挿入では、転写のベースラインレベルが最小であるが、上記インデューサーの存在下で強く刺激されるプロモーターを生じる。このため、ウイルスタンパク質の産生は、感染性ウイルス粒子を形成させうるインデューサーを発現する293系で活性化される。逆に、それは細菌源のインデューサーを天然で産生しない感染宿主細胞だと著しく減少する。ウイルス遺伝子の調節は、テトラサイクリンに応答しないプロモーターのコントロール下におかれた外来ヌクレオチド配列の発現に効果をもたない。

本発明のアデノウイルスベクターは先行技術のベクターの使用に固有の欠点に

対して有利なアプローチを提供するが、その理由はそれらが使用の安全性と産生の容易さを合わせて持っているからである。一方、それらは産業上の要求に合致した高力価で慣用的な相補系により増殖され、他方それらは外来ヌクレオチド配列を *in vivo* で移して、有害作用（宿主での炎症反応）を制限しながら安定的に発現させることができる。それらはヒト遺伝子治療に特に最も適している。

したがって、本発明の主題は、1以上のウイルス遺伝子を有した発現単位を含んでいることで特徴付けられるウイルスベクターであり、上記発現単位は相補細胞で機能性だが、宿主細胞で機能性でない。

本発明の目的のために、“ウイルスベクター”はゲノムが修飾された親ウイルスから得られる。これらの修飾は多様（1以上のヌクレオチドの欠失、変異および/または付加）であって、ウイルスゲノムのコード領域中またはこれらの領域外、例えばプロモーター領域中に位置する。参考のために、一部のウイルス配列は失わせるか、非機能性にさせるか、または他の配列、特に発現が宿主細胞で求められる外来ヌクレオチド配列と代えられる。

本発明によるウイルスベクターは、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、AAV（アデノ関連ウイルス）およびボックスウイルス、特にワクシニア、トリボックスまたはカナリヤボックスウイルスのような様々なウイルスから誘導される。このようなベクターとそれらの作製技術は、当業者に知られている。

しかしながら、本発明にとり特に適したベクターはアデノウイルスベクターである。それはヒト、イヌ、トリ、ウシ、ネズミ、ヒツジ、ブタまたはサル起源のアデノウイルスから、あるいは異なる起源のアデノウイルスゲノム断片を含んだハイブリッドから誘導される。イヌ起源のアデノウイルスCAV-1またはCAV-2、トリ起源のDAVまたは代わりにウシ起源のBadタイプ3（Zakharchuk et al., 1993, Arch.Virol., 128, 171-176; Spibey and Cavanagh, 1989, J.Gen.Virol., 70, 165-172; Jovenne et al., 1987, Gene, 60, 21-28; Mittal et al., 1995, J.Gen.Virol., 76, 93-102）が更に具体的に挙げられる。しかしながら、好ましくは血清型C、絶対的に好ましくは2または5型のヒトアデノウイルス由来のアデノウイルスベクター（Graham and Preveet, 1991, Methods in Molecular B

iology, vol. 7, p 109-128; Ed: E. J. Murey, The Human Press Inc. ) が好ましい。

本発明の有利な態様は、複製に必要な1以上のウイルス遺伝子が失われているか、または非機能性にされている、複製に欠陥があるベクターからなる。自律複製できないこのようなベクターは相補細胞で増殖される。“相補細胞”という用語は、本発明によるベクターに欠陥がある機能をin transで供給できる細胞を表す。換言すれば、それは、自ら産生できないが、感染性ウイルス粒子の形成に必要なものである、上記ベクターの複製およびエンキャプシデーションに必要なタンパク質、初期および/または後期タンパク質を産生することができる。説明すると、本発明による好ましいアデノウイルスベクターはE1領域のほとんどを欠いているため、そのベクターが産生できないE1領域によりコードされた包括的タンパ

ク質をin transで供給できる293系のような相補細胞が利用される。“感染性ウイルス粒子”とは、宿主細胞に感染してウイルスゲノムをそこに入れさせる能力を有したウイルス粒子を意味すると理解されている。

好ましい態様によれば、本発明によるウイルスベクターは組換え体である。このため、それは宿主細胞でその発現に必要な要素のコントロール下におかれた外来ヌクレオチド配列を含んでいる。“外来ヌクレオチド配列”とは、いずれかの起源であって、本発明で用いられる親ウイルスのゲノムに通常存在しないか、またはもし存在するならば異なるゲノム関係にある核酸に関する。本発明の関係において、外来ヌクレオチド配列は1以上の遺伝子、特に治療対象の遺伝子からおそらく構成されることになる。

一般的に言えば、外来ヌクレオチド配列は、後で対象のタンパク質に翻訳されるアンチセンスRNAおよび/またはmRNAをコードすることができる。それはゲノムタイプ、相補的DNA(cDNA)タイプまたは混合タイプ(少なくとも1つのイントロンが失われたミニ遺伝子)からなる。それは成熟タンパク質または成熟タンパク質の前駆体、特にシグナルペプチドを含んだ分泌を意図する前駆体をコードする。更に、コードされる産物は、天然でみられるタンパク質(天然または端部切り取りタンパク質)、または代わりに別な起源の配列の融合から得られるキメラタンパク質、あるいは改善されたおよび/または改変された生物学的

性質を示す変異タンパク質から全部または一部になっている。このようなタンパク質は分子生物学の慣用的技術により得られる。

本発明の関係では、下記ポリペプチドをコードする遺伝子を用いることが有利である：

- サイトカインまたはリンホカイン（インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ 、インターロイキン、IL-2、IL-6、IL-1 $\alpha$ またはIL-1 $\beta$ 、腫瘍壊死因子（TNF）、コロニー刺激因子（GM-CSF、C-CSF、M-

CSF等））；

- 細胞または核レセプター（病原生物（ウイルス、細菌または寄生虫）、好ましくはHIVウイルス（ヒト免疫不全ウイルス）により認識されるレセプター、あるいはそれらのリガンド）；

- 遺伝子障害に関与するタンパク質（因子VII、因子VIII、因子IX、ジストロフィンまたはミニジストロフィン、インシュリン、CFTR（嚢胞性繊維症貫膜透過レギュレーター）タンパク質、成長ホルモン（HGF））；

- 酵素（ウレアーゼ、レニン、トロンビン等）；

- 酵素阻害剤（ $\alpha$ 1-抗トリプシン、抗トロンビンIII、ウイルスプロテアーゼの阻害剤等）；

- 腫瘍またはがんの開始または進行を少くとも部分的に阻止できる抗腫瘍効果を有したポリペプチド（アンチセンスRNA、抗体、細胞分裂または形質導入シグナルで作用する阻害剤、腫瘍抑制遺伝子の発現産物、例えばp53またはRb、免疫系を刺激するタンパク質等）；

- 主要組織適合遺伝子複合体クラスIまたはIIのタンパク質、あるいは対応遺伝子の発現で作用する調節タンパク質；

- ウイルス、細菌または寄生虫感染および/またはその進行を阻止できるポリペプチド（免疫原性を有する抗原ポリペプチド、抗原エпитープ、抗体、競合により天然タンパク質の作用を阻害できるトランスドミナント変異体等）；

- 毒素（単純ヘルペスウイルス1チミジンキナーゼ（HSV-1 TK）、リシン、コレラまたはジフテリア毒素等）または免疫毒素；および

- マーカー (β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等)

このリストは限定的ではなく、他の遺伝子も用いてよいことが指摘されるべきである。

更に、本発明で用いられる外来ヌクレオチド配列は、トランスフェクトされた

細胞を選択または同定できる選択遺伝子を追加的に含んでもよい。抗生物質 G418 に対する耐性を付与する neo 遺伝子 (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする)、dhfr (ジヒドロ葉酸レダクターゼ) 遺伝子、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子、pac (プロマイシンアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子または代わりに gpt (キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ) 遺伝子が挙げられる。一般的に言えば、選択遺伝子は当業者知られている。

宿主細胞で外来ヌクレオチド配列の発現に必要な要素は、RNA (アンチセンスRNAまたはmRNA) への転写とmRNAからタンパク質への翻訳を行える包括的な要素を意味すると理解される。これらの中では、プロモーターが特に重要である。それは真核またはウイルス起源の遺伝子から単離しても、構成性でもまたは調節性でもよい。一方、それは対象となっている遺伝子の天然プロモーターであってもよい。(以下で記載される) ウイルス遺伝子の発現のための単位中に含まれたものとは異なるプロモーターを用いることも好ましい。更に、プロモーター活性を改善する、転写を阻害する領域をなくする、構成的プロモーターを調節性にするかまたはその逆にする、制限部位を導入する等のように修飾してもよい。例えば、HSV-1 TK、ネズミまたはヒトPGK (ホスホグリセラーゼキナーゼ)、α1-抗トリプシン (肝臓特異性) および免疫グロブリン (リンパ球特異性) 遺伝子のプロモーター、SV40 ウイルス (サルウイルス40) 初期プロモーター、レトロウイルスLTR、あるいは代わりに特にヒトアデノウイルスタイプ2のアデノウイルスMLPプロモーターが挙げられる。

当然ながら、本発明で用いられる外来ヌクレオチド配列は、宿主細胞で発現に必要な要素 (イントロン配列、シグナル配列、核局在化配列、転写終結配列、IRESまたは他のタイプの翻訳開始部位等) または代わりにその維持に必要な要

素を更に追加的に含むことができる。このような要素は当業者に知られている。

上記のように、本発明によるウィルスベクターは、相補細胞で機能性だが宿主細胞で機能性でないという有利な特徴を有した、1以上のウィルス遺伝子を有する発現単位を含んでいる。“機能性”とは、感染性ウィルス粒子の形成を行うために十分な量で十分な時間にわたるウィルス遺伝子の発現を意味すると理解されている。“非機能性”とは、親ウィルスでの発現レベルと比較して（好ましくは少なくとも1/10またはゼロ発現まで）減少したウィルス遺伝子の発現を意味すると理解されている。機能特徴は発現単位に含まれるウィルス遺伝子の産物の産生に際して現れるが、分子生物学、免疫学、生化学または酵素学の標準技術によりこれらの産物について証明することができる。非機能特徴は、ウィルス産物の産生の不在下で、または代わりに産生に際して、減少したレベルで現れる。

有利なことに、上記発現単位は親ウィルスDNAに存在しない1以上の異種調節配列を含んでいる。発現でネガティブに作用するリプレッサータイプのレギュレーター、または好ましくはポジティブな作用を発揮するインデューサータイプのレギュレーターに応答する配列を利用してもよい。本発明の関係で用いられる調節配列はウィルス、原核または代わりに真核のいかなる起源であってもよい。一般的に言えば、調節配列は当業者に入手しうる文献で記載されている。配列が天然配列に対して修飾されたが、類似したまたは改善された調節機能を発揮するホモログを用いることも可能である。これらの修飾は、1以上のヌクレオチドの付加、欠失および／または置換による。

本発明で求められる目的によれば、調節配列はウィルス遺伝子の発現を異なるレベル、即ち転写、伸長、輸送、mRNAの安定性または代わりに翻訳のレベルで調節することができる。それは上記発現単位の様々な箇所に、例えば特にその効果が転写レベル（好ましくはTATAボックスの上流、後者から数百塩基対以内）であるときにはプロモーター、またはその作用が後の転写工程で発揮されるときには転写（可能であれば非コード）配列に存在してよい。1～25、有

利には1～20、好ましくは1～10、絶対的に好ましくは1～7の調節配列を

用いることが可能である。

本発明の目的から、“インデューサー”という用語は、上記調節配列に結合することで直接に、あるいは他の細胞またはウイルス因子で間接的に、調節配列のコントロール下におかれたウイルス遺伝子の発現を開始または活性化する能力を有した分子を表す。それはリプレッサーの作用も妨げることができる。対照的に、“リプレッサー”はそれが作用する調節配列のコントロール下におかれたウイルス遺伝子の発現を阻害または阻止する能力を有しており、これは直接または間接的に生じる。

これらの定義はラクトース (lac) オペロンの例により説明される。lac I 遺伝子は、“オペレーター”と称される短い調節配列に結合して、それによりラクトースの代謝経路の酵素をコードする構造遺伝子の転写を妨げるリプレッサーをコードしている。インデューサーの存在下で、後者はリプレッサーと結合して、オペレーターにもはや結合できないために転写を起こすことができない不活性形にそれを変換する。

これらレギュレーターの部分またはアナログを用いることも、それらの効力を改善するかまたはそれらの特異性を変えるために考えることができる (例えば、テトラサイクリンオペロンから誘導された調節配列を含んだプロモーターからの転写を阻害する上でテトラサイクリンより10倍有効なアンヒドロテトラサイクリン、あるいは最近Gossen et al., 1995, Science, 268, 1766-1769に記載された逆トランスアクチベーター)。更に、本発明で用いられるレギュレーターは、異なる起源のポリペプチドの融合から得られるハイブリッドタンパク質であってもよい。好ましい組合せは、本発明で用いられる調節配列を認識または結合できるポリペプチド (例えば、テトラサイクリンリプレッサー (tetR) またはエストロゲンリプレッサーERから誘導される) と、発現を活性化できるポリペプチド

(例えば、転写因子と相互作用できるGal4またはVP16タンパク質の活性化ドメイン) からなる。

下記表1は、本発明の関係で使用できる調節配列とレギュレーターの一部について掲載している：

調節配列の起源	インデュース (+) リプレッサー (-) 金属イオン (+)	挿入部位	参考文献
MRE (金属応答要素) メタロチオネイン遺伝子		5' TATA	Makarov et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 1504-1505
トリプトファンオペロン	トリプトファン (-)	5' TATA	Yanofsky et al., 1981, Nucleic Acids Res. 9, 6647-6668
lacオペレーター	lacI 遺伝子の産物 (-)	5' TATA	Miller and Reznikoff (Eds), The operons (Cold Spring- Harbor Laboratory, New York
tetオペレーター	VP16-TetR タンパク質 (+)	5' TATA	Gossen and Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547-5551
tetオペレーター	TetR (-)	3' TATA	Kim, 1995, J. Virol. 69, 2565-2573
TAR (トランス活性化応答領域)	TAT (+)	転写 5' 配列	Steffly and Wong-Staal, 1991 Microbiological Reviews, 55 193-205
RRE (REV応答要素)	REV (+)	転写 3' 配列	Steffly and Wong-Staal, 1991 Microbiological Reviews, 55 193-205
GRE (グルココルチコイド 応答要素)	グルココルチコイド (+)	5' TATA	Israel and Kaufman, 1989, Nucleic Acids Res. 17, 4589-4604
PRE (プロゲステロン応答要素)	プロゲステロン (+)	5' TATA	Gronemeyer et al., 1987, EMBO J. 6, 3985-3994
Gal4UAS (Gal4上流活性化配列)	Gal4 (+)	5' TATA	Webster et al., 1988, Cell, 52, 169-178
ERE (エストロゲン応答要素)	エストロゲン (+)	5' TATA	Klein-Hitpaß et al., 1986, Cell, 46, 1033-1061

挿入部位は参考のために示しただけであり、限定する意味ではない。

本発明の具体的態様によれば、文献で“オペレーター”と称される細菌テトラサイクリンオペロン (tetO) から誘導された調節配列が用いられる。一般的に言えば、テトラサイクリン耐性オペロンはトランスポゾン Tn10 によりコードされている (Hillen et al., 1984, J. Mol. Biol., 172, 185-201)。調節は、様々

なレギュレーターのための結合部位を構築している、“オペレーター” (tet O) と称される短いヌクレオチド配列により行われる。このため、テトラサイクリンリプレッサー (tet R) または抗生物質テトラサイクリンの結合は、転写のレベルを著しく減少させる。逆に、活性化効果は、単純ヘルペスウイルスのVP16タンパク質の活性化ドメインの130C末端アミノ酸とtet Rとの間の融合から生じる、文献で“テトラサイクリントランスアクチベーター (tTA)” と称されたタンパク質を用いることにより得られる。Gossen and Boujard (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547-5551) では、この調節系が真核細胞で機能性であることを最近示した。基本的転写配列 (TATAボックス、転写開始部位等) の上流にあるtet Oのいくつかのコピーのコントロール下におかれたリポーター遺伝子の発現は、tTAの同時発現により検出でき、テトラサイクリンの添加により阻害される。Kim のグループ (1995, J. Virol., 69, 2565-2573) は、その面に関して、プロモーターのTATAボックスの下流に位置するtet O配列を利用しており、この場合に転写はtet Rの作用により阻害される。

本発明の関係において、ベースライン転写レベルが天然で非常に低い、インデューサーtTAにより活性化できてテトラサイクリンにより抑制できるプロモーターを生させる組合せ“tet O - 最小プロモーター” (5' → 3' 方向) が特に最も好ましい。しかしながら、tet O配列がTATAボックスの3' 側か、または代わりに後者の各側におかれて、tet Oを認識するtet Rの配列を含んだリプレッサーにより抑制されうるプロモーターを用いることも可能である。

好ましい変形例として、本発明によるアデノウイルスベクターはE1領域の全部または一部か、代わりにE3領域の全部または一部を欠いたアデノウイルスのゲノムからなることが好ましい。有利には、E3領域の部分、特にgp19k (Gooding and Wold, 1990, Critical Reviews of Immunology, 10, 53-71) をコードする遺伝子に対応した部分を留めていることが好ましく、上記部分は上記のような発現単位に含まれていないが、慣用的同種 (E3) または異種プロモーターのコントロール下におかれている。特にE4またはE2領域でウイルスゲノムの他

の修飾を行えることも自明である。変異または追加欠失を導入することも有利である。この点を説明すると、温度感受性変異がE2A領域のDBP（DNA結合タンパク質を表す）遺伝子に影響を与える(Ensinger and Ginsberg, 1972, J. Virology 11, 328-339)。

好ましい態様によれば、本発明によるアデノウイルスベクターはE2、E4またはL1 - L5領域の1以上のウイルス遺伝子を有した発現単位を含んでなる。有利な変形例では、ORF3、6および/または7をコードする配列だけをE4領域から残している（E4領域のこれらの限定された欠失はE4機能の相補を要しない；Ketner et al., 1989, Nucleic Acids Res., 17, 3037-3048）。

いくつかの発現単位を含んだアデノウイルスベクターを思いどおりに有することが有利であり、すべての組合せ（E2およびE4、E2およびL1 - L5、E4およびL1 - L5またはE2、E4およびL1 - L5）を考慮することができる。同様に、好ましくはポジティブに作用する調節配列（例えばTAR、RRE、tet o等）が選択される。実施の簡単さの理由から、単一インデューサーを含んだ相補系でアデノウイルスベクターを増殖させることができる同一の調節配列をその単位が保有している場合が好ましい。

本発明は感染性ウイルス粒子と、本発明によるウイルスベクターを含んだ真核宿主細胞にも関する。上記宿主細胞は有利には哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞であり、ゲノムに組み込まれた形または非組み込み形（エピソーム）で上記ベクターを含んでいる。それには造血（全能性幹細胞、白血球、リンパ球、単球またはマクロファージ等）、筋肉、肺臓、肝臓、上皮または繊維芽細胞起源の一次または腫瘍細胞がある。

本発明の主題には相補細胞が更にあり、それはインデューサーおよび/またはリプレッサー（レギュレーター）を含むことで特徴付けられる。要求に応じて、後者は培地に加えても、あるいは細胞自体により安定的にまたは一過性で産生させてもよい。好ましくは、本発明による相補細胞は上記レギュレーターをコードするDNA断片の導入により改変される。細胞中に核酸（合成、ウイルスまたはプラスミドベクター、裸のDNA等）を導入するためのすべての標準手段、例え

ばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着およびプロトプラスト融合が本発明の関係で用いられる。本発明の関係では、単一のレギュレーター、特にインデューサーだけを産生する相補細胞を作ることが有利である。しかしながら、いくつかのインデューサーを産生する細胞を思いどおりに有することも有利である。

有利な態様によれば、本発明による相補細胞は本発明によるウイルスベクター、特にアデノウイルスベクターをin transで補うことができる。この関係において、E1および/またはE4機能用の相補細胞が有利に選択される。したがって、本発明はE1機能およびもう1つのアデノウイルス機能（後期または初期）に欠陥がある第二世代アデノウイルスベクターの相補が意図された細胞にも関する。このような細胞は、発現がいずれかのプロモーターによりコントロールされるアデノウイルスのE1領域の全部または一部と、調節配列、例えばトランスアクチベーターtTAにより活性化できる少くとも1つ、好ましくは1~20のtetO配列をその5'末端に伴うプロモーターのコントロール下におかれた、E1領域以外のアデノウイルス領域の全部または一部とを含んでいる。有利な変形例ではCMVウイルス（サイトメガロウイルス）由来の最小プロモーターからなり、そ

の上流にはヘッド-テイル方向に7つのtetO配列がある。インデューサーはtetO配列のコントロール下におかれたアデノウイルス配列の前に、それと同時にまたはその後で本発明による相補細胞中に導入されるか、あるいは前記のようにそれは培地に加えられる。相補細胞でインデューサー（例えば、tTA）を発現させ、アデノウイルス遺伝子の発現がもはや望まれないときにはリプレッサー（例えば、テトラサイクリン）を培地に加えることも考えることができる。

好ましい例によれば、E1領域以外のアデノウイルス領域は：

(i) E4領域、特に後者のオープンリーディングフレーム6および7（ORF 6/7）をコードする配列の全部または一部、あるいは代わりに

(ii) E2領域、特に後者のDBPタンパク質（DNA結合タンパク質）または温度感受性変異体をコードする配列の全部または一部

からなる。

当然ながら、本発明による相補細胞は、発現が適切な要素のコントロール下におかれた第三アデノウイルス領域を更に含むことができる。この関係において、好ましい細胞は複製に不可欠な包括的初期機能に欠陥があるアデノウイルスベクターの相補向けであって、E1、E2およびE4領域の全部または一部を含んでおり、後の2領域の一方、他方または双方は前記のような調節配列を伴うプロモーターのコントロール下におかれている。

本発明による相補細胞の利点の1つは、それが慣用的なウイルスベクターまたは本発明によるウイルスベクターから高力価の感染性ウイルス粒子を産生できることである。最終プレパレーション（精製後）のウイルス力価は、有利には $5 \times 10^8$  pfu/ml以上、好ましくは $1 \times 10^9$  pfu/ml以上、絶対的に好ましくは $5 \times 10^9$  pfu/ml以上、更に一層好ましくは $5 \times 10^{10}$  pfu/ml以上である。pfuという用語は、許容細胞の感染によりプラークを形成しうる粒子に関する理解されている。pfuの数を評価するための技術は慣習的であって、当業者に知ら

れている。寒天技術（Graham and Prevec, 1991, 前掲）が挙げられる。通常、ウイルス力価pfu/mlは遺伝子トランスファー機能を発揮できる感染性ウイルス粒子の実際数に等しいか、またはそれ以下である。実際には、あるパーセンテージは許容細胞で有効に増殖して溶解プラークを形成することができない。本発明による相補細胞で産生された感染性ウイルス粒子の力価は、有利には $5 \times 10^8$  ifu/ml以上、好ましくは $1 \times 10^{10}$  ifu/ml以上、絶対的に好ましくは $5 \times 10^{10}$  ifu/ml以上、更に一層好ましくは $5 \times 10^{11}$  ifu/ml以上である。ifuという用語は、非許容標的細胞に感染し、そのゲノムをトランスファーして、後者により保有された遺伝子の発現を行うことができる感染性粒子に関する理解されている。ifuの数は、対象の遺伝子またはウイルス遺伝子を発現する標的細胞の数により評価される。当業者はそれらの発現を検出する上で用いられる技術：免疫蛍光、ウェスタンブロッティングまたは代わりに染色等について知っている。例えば、対象の遺伝子がLacZ遺伝子からなるとき、タンパク質 $\beta$ -ガラクトシダーゼはX-Gal（5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル  $\beta$ -D-ガラクト

ピラノシド)で染色することにより視覚化され、青色細胞の数がカウントされる。CFTR療法遺伝子が用いられるとき、発現産物はウェスタンブロッティングにより視覚化される。特別な抗体を用いてアデノウイルスDBP、ペントンまたは繊維タンパク質を発現する細胞を捜すことも可能である。

本発明による相補細胞は、アデノウイルスゲノムの適切な部分とレギュレーターをコードするDNA断片のトランスフェクションにより、様々な細胞系から作ることができる。考える系統の中では、ATCC (Rockville, USA) のようなコレクションで入手しうるVer o腎臓(サル)、BHK (ハムスター)、MDCK (イヌ) およびMBDK (ウシ) 系、CHO系 (ハムスター) または代わりにヒト系 (HeLa、A549、MRC5、W138等) が挙げられる。しかしながら、特に適切な細胞は293系である。一次ヒト網膜細胞のような一次系の

使用も考えられる。

本発明による感染性ウイルス粒子は、当業界で慣用的な技術 (Graham and Pre vect, 1991, 前掲) に従い、例えば適切な細胞中へのベクターおよびアデノウイルス断片のコトランスフェクションによるか、または代わりに非機能性ウイルス機能をin transで供給するヘルパーウイルスにより作製される。連結または代わりに相同的組換えにより Escherichia coli (E.coli) でin vitroでウイルスベクターを作ることとも考えることが可能である (例えば、French Application 94/14470参照)。

本発明は：

- (i) ウイルスベクターが、トランスフェクトされた相補細胞を得るために、in transで上記ベクターを相補する相補細胞中に導入され、
  - (ii) 上記トランスフェクトされた相補細胞がウイルス遺伝子の発現および上記感染性ウイルス粒子の産生を行うために適切な条件下で培養され、および
  - (iii) 上記感染性ウイルス粒子が細胞培養物中で回収される
- ことからなる、本発明によるウイルスベクターを含んだ感染性ウイルス粒子の作製方法にも関する。

当然ながら、感染性ウイルス粒子は培養上澄から回収されるが、細胞からも回

収される。有利な態様によれば、本発明によるアデノウイルスベクターおよび相補細胞が用いられる。もう1つの変形例によれば、慣用的な相補細胞が利用される。発現単位が活性化しうる調節配列を含んだ場合だと、インデューサーを培地に加えることが必要かもしれない。用いられる量は、インデューサーの実際の性質に依存する。当業者であれば具体的データに従い最良の濃度に明らかに調整することができる。

本発明は、本発明による相補細胞を用いた、慣用的なウィルスベクターを含む感染性ウィルス粒子の作製方法にも関する。例えば、(i) 7つのtetO配列

を5'末端に伴う最小プロモーターのコントロール下にあるE4領域のORF6/7と(ii) 同一のプロモーターにより指図されるトランスアクチベーターtTAを発現する293細胞中への、E1およびE4機能に欠陥があるウィルスベクター(E1<sup>-</sup>E4<sup>-</sup>)の導入によれば、複製に欠陥があるが宿主細胞に対しては

感染性であるウィルス粒子を作製することができる。

本発明の主題は、治療または予防剤として本発明によるウィルスベクター、感染性ウィルス粒子、相補細胞あるいは真核宿主細胞を、薬学的観点から許容されるビヒクルと組合せて含んでなる、医薬組成物にも関する。本発明による組成物は、特に：

- 遺伝子障害（血友病、嚢胞性繊維症、糖尿病またはミオパシー、Duchenne's ミオパシーおよびBecker's ミオパシー等）
  - がん遺伝子またはウィルスにより誘導されるようながん
  - 肝炎BまたはCとエイズ（HIV感染から起きる後天性免疫不全症候群）のようなウィルス疾患、および
  - ヘルペスウィルスに起因するウィルス感染のような再発ウィルス疾患
- のような障害の予防または治療処置向けである。

本発明による医薬組成物は常法で製造される。特に、治療または予防剤の治療有効量が希釈剤のようなビヒクルと組み合わせられる。本発明による組成物は、局所、全身またはエアゾールで、特に胃内、皮下、心臓内、筋肉内、静脈内、腹腔

内、腫瘍内、肺内、鼻内または気管内経路により投与される。投与は1回分の用量で、あるいはある時間間隔後に1回または数回繰返される用量で行われる。適切な投与経路および投薬量は、様々なパラメーター、例えば治療される個体または障害、あるいは代わりにトランスフェクトされる対象遺伝子に応じて変わる。

特に、本発明によるウイルス粒子は $10^4 \sim 10^{14}$  p f u (プラーク形成単位)

、有利には $10^5 \sim 10^{13}$  p f u、好ましくは $10^6 \sim 10^{11}$  p f uの用量

で処方される。その処方では薬学的観点から許容されるアジュバントまたは賦形剤も含有することができる。

最後に、本発明は、好ましくは遺伝子治療によるヒトまたは動物体の治療向け医薬品の製造のための、本発明によるウイルスベクター、感染性ウイルス粒子、相補細胞または真核宿主細胞の治療または予防用途に関する。第一の可能性によれば、医薬品は(例えば、到達しうる腫瘍では静脈内注射により、肺臓ではエアゾールによる等) *in vivo* で直接投与される。患者から細胞(骨髓幹細胞、末梢血リンパ球、筋肉細胞等)を取出し、当業界の技術に従い *in vitro* でそれらをトランスフェクトまたは感染させ、患者にそれらを再投与することからなる *ex vivo* のアプローチを採択することも可能である。発現単位がリプレッサーに応答するレギュレーター配列を含んでいる場合には、ウイルス遺伝子の発現を阻止または制限するためにリプレッサーを投与することが考えられる(リプレッサーの事前、同時または事後投与、あるいは慣用的ベクターによる同時発現)。

本発明は治療方法にも及び、それによれば本発明によるウイルスベクター、ウイルス粒子、真核宿主細胞または相補細胞の治療有効量がこのような治療を要する患者に投与される。

本発明は下記図面と下記例を参考にして更に詳しく記載されている。

図1は(0~100の任意単位で表された)ヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムの概略図であり、異なる遺伝子の位置を示している。

図2は、CMVプロモーター(pCMV)により指示されるtTAと、SV40プロモーターのコントロール下にあるpac(プロマイシン耐性)選択遺伝子の構成性発現を行える、ベクターpTG4673の概略図である。

図3はtTAにより活性化しうるE4領域のORF6および7の発現用カセットを含んだヒトアデノウイルスベクターpTG4696の概略図である。

図4はアデノウイルス5ゲノムの5'末端の部分を含んだベクターpTG343の概略図である。

図5は、E1およびE3領域の大部分が失われた第一世代組換えアデノウイルスベクター、ベクターpTG4662の概略図である。組換えカセットは、アデノウイルスMLPプロモーター(Ad2)と、その後にβ-ガラクトシダーゼをコードする細菌LacZ遺伝子およびSV40ウイルスポリアデニル化シグナル(pA)からなる。

図6は、E1およびE3領域の大部分が失われたアデノウイルスベクターであって、tTAの構成性発現用のカセットを含んだ、ベクターpTG4682の概略図である。

図7は、E1、E3およびE4領域の大部分が失われたアデノウイルスベクターであって、tTAの構成性発現用のカセットを含んだ、ベクターpTG4683の概略図である。

図8は、(図でtetO-CMV1と示されたtetO配列の7コピーにより先行されたCMV最小プロモーター、(-53~+1)のコントロール下で)tTAの誘導性発現を行える、ベクターpTG4675の概略図である。

図9は、E1およびE3領域の大部分が失われたアデノウイルスベクターであって、tTAの誘導性発現用のカセットを含んだ、ベクターpTG4684の概略図である。

図10は、E1、E3およびE4領域の大部分が失われたアデノウイルスベクターであって、tTAの誘導性発現用のカセットを含んだ、ベクターpTG4685の概略図である。

図11は、tetO配列の7コピーにより先行されたCMV最小プロモーターのコントロール下にあるアデノウイルスE4領域のORF6/7およびtTAと、プロマイシン耐性を付与するpac選択遺伝子の発現を行える、ベクターpTG5606の概略図である。

図12は、ベクターpTG9579で一時的にトランスフェクトされてテトラサイクリンの存在下(+)および不在下(-)で培養された293細胞におけるDBPタンパク質の発現のウエスタンブロット分析である。

例

下記例は本発明の一態様について説明している。

下記構築は Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) で詳述された遺伝子工学および分子クローニングの一般的技術に従い、または市販キットが用いられるときには製造業者の説明に従い行う。細菌プラスミドを用いたクローニング工程は E.coli 株 5 K (Hubacek and Glover, 1970, J. Mol. Biol., 50, 111-127) または B J 5 1 8 3 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol., 166, 557-580) で行う。後者の株が相同的組換え工程で優先的に用いられる。PCR増幅技術は当業者に知られている(例えば、PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, Innis, Gelfand, Sninsky and White ed., Academic Press Inc. 参照)。制限部位の修復に用いられる技術は、E.coli DNAポリメラーゼ I (Klenow) の大断片を用いて5' 突出末端を満たすことからなる。

細胞生物学関係については、細胞は当業者に周知の標準技術に従いトランスフェクトさせる。リン酸カルシウム技術 (Maniatis et al., 前掲) が挙げられるが、DEAE-デキストラン技術、エレクトロポレーション、浸透圧ショックに基づく方法、マイクロインジェクションまたはリボソームの使用に基づく方法のようないずれか他のプロトコールも用いてよい。培養条件はそれらの面に関して慣用的である。

下記例では、下記細胞系が用いられる：

Ad5ゲノム(5' ITR、エンキャプシデーション配列およびE1領域)の5' 末端の染色体への組み込みから得られる、ヒト胚腎臓由来の293系 (Graham et al., 1977, 前掲) (レファレンスCRL1573でATCCから入手できる) Ad5 E4領域(nt32800~35826)とpac選択遺伝子の発現用カセットを保有したプラスミドpTG1653で安定的に形質転換された29

3系に由来するTG1653系（国際出願WO94/28152、実施例8に記載されている）

他の細胞系も用いてよいことが理解されるべきである。

更に、下記の異なる構築で用いられるアデノウイルスゲノム断片は、レファレンスM73260でGenebankデータベースに開示されているようなAd5ゲノムのヌクレオチド配列でそれらの位置について正確に示されている。

例1：アデノウイルス遺伝子の発現を活性化しうるインデューサーを発現する相補系

この例では、(1) トランス活性化タンパク質tTAを構成的に発現できる293系由来の相補系と、(2) E4領域の一部ウイルス遺伝子がtTAに応答するtetO配列のコントロール下におかれたアデノウイルスベクターの構築について記載している。その系中へのベクターのトランスフェクション後にウイルス粒子の形成を行うが、その理由はE1およびE4機能がアデノウイルスE1領域およびtTAの発現産物の供給によりトランス相補されるからである。キメラtTAタンパク質を天然で産生しない感染宿主細胞において、E4と結果的に後期タンパク質（E4依存性発現）の発現は著しく減少し、それにより細胞性免疫および炎症の問題を制限する。

1. トランスアクチベーターtTAを発現する相補系の構築

プロマイシンで形質転換細胞の選択を行えるベクターpTG6529を最初に構築する。そのベクターは、SV40プロモーターおよびpac遺伝子とその後SV40ウイルスポリAシグナルから構成される発現カセットのpポリIII-I（Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201）中へのクローニングから得る。この

ような構築は、文献に記載された対応配列からみて、当業者の能力内に属する（Morgenstern and Land, 1990, Nucleic Acid Res. 18, 3587-3596；GenebankレファレンスJ02400）。

並行して、ベクターpUHD15-1（Gossen and Bujard, 1992, 前掲）を酵素SspIおよびHpaIで切断する。CMVプロモーターにより先行されるtTAをコードする配列を含んだ断片をpTG6529の同部位間にクローニング

して、pTG4673を得る(図2)。

ベクターpTG4673を常法で293細胞中にトランスフェクトする。当然ながら、tTAの発現用ベクターおよび選択ベクター(例えばpUHD15-1およびpTG6529)をトランスフェクトさせることも可能であった。トランスフェクト後、細胞を選択培地(プロマイシン1 $\mu$ g/ml)で培養する。80の耐性クローンを単離し、これらのうち35について、発現がtetO配列によりコントロールされるマーカー遺伝子をトランス活性化するそれらの能力に関して試験した。実施の簡単さとアッセイの感度の理由から、ルシフェラーゼ遺伝子を選択した。

ルシフェラーゼをコードする配列がtetOの7コピーにより先行されたCMV最小プロモーターのコントロール下におかれたリポーターベクターpUHC13-3(Gossen and Bujard,1992,前掲)を用いる。試験は、試験されるクローン中への一時的トランスフェクションにより行う。2日後、ルシフェラーゼ活性はPromega市販のキット("Luciferase Assay System")と、サンプルの測定のためにシンチレーションカウンター(LS5000TD、Beckman)を用いて、細胞抽出物で評価する。そのアッセイでは評価されたクローンのうち10について陽性とわかり、それらがtetO配列を認識してそれらのコントロール下におかれた遺伝子の発現を活性化しうる機能性tTA産物を産生することを示している。

## 2. E4遺伝子の発現がtTAで誘導しうるアデノウイルスの構築

上記のように、E4領域のORF6および7をコードする遺伝子の発現は、相補の必要性なしにウイルス複製を行う上で十分である。この例では、発現がtetOのコントロール下におかれて結果的にtTAの存在下で促進されるORF6および7をコードする配列を除いて、E1およびE3領域とE4領域の一部が失われたアデノウイルスベクターの構築について記載している。

ベクターpUHD10-3は、7つのtetOコピーとCMV最小プロモーター(転写開始部位に対して-53位;Gossen and Bujard,1992,前掲)を保有したXhoI-EcoRI断片のプラスミドpBR322中へのクローニングから

得る。BamHIで切断後（プロモーター領域の下流に位置する部位）、pTG1653から得られてORF6および7をコードする配列を保有したBglII-BamHI断片を挿入して、pTG4658を得る。

ベクターpTG4664は、BglII部位が予め取り除かれたpポリII (Lathé et al., 1987, 前掲) のKpnI-SmaI部位間へのKpnI-HpaIアデノウイルス断片（ヌクレオチド25838-32004）のクローニングから得る。次いでE3の大部分（ヌクレオチド27871-30748）を酵素切断（HpaI-HindIII）により除く。

ORF6および7の調節発現用カセットを保有したXhoI-HpaI断片をpTG4658から単離し、BglIIで切断されてKlenow断片で処理されたベクターpTG4664中にKlenow断片の作用後に挿入して、カセットの方向に従いpTG4668およびpTG4669を得る。後者は相同的組換えによりアデノウイルスベクター中に導入する。“MLPプロモーター-LacZ遺伝子SV40pA”発現カセットがE1領域の代わりにクローニングされた第二世代ベクターに由来する（そこから複製に不可欠なE1およびE4領域と非必須E3領域が失われている（ヌクレオチド27871-30748の欠失）；国際出願WO9

4/28152の実施例4に記載されている）組換えベクターpTG4663がこの目的のために用いられる。E.coli細胞をHindIIIで開裂されたpTG4668またはpTG4669とSpeIで直鎖化されたウイルスベクターpTG4663で同時形質転換させて、pTG4696（図3）およびpTG4697を得る。

類似タイプの他のアデノウイルスベクターも作製できる。例えば、tetO配列のコントロール下にE2領域の遺伝子をおくことも考えることが可能である。当業者であれば、ベクターpUHD10-3から単離されたもののような調節しうるプロモーターによりE2プロモーターを置き換えさせるか、あるいはE2プロモーターのTATAボックスの上流にある配列を除去させて、tetO配列の1以上（好ましくは7つ）のコピーをそれらの位置に導入させるという、分子生物学技術に精通している。例えばE2、E4および/またはMLPのウイルス遺

伝子の発現を指図するプロモーターのTATAボックスの上流でtetOの挿入により、いくつかのレベルで調節されるベクターを構築することも可能である。

### 3. ウイルス粒子の作製

ウイルスベクターpTG4696またはpTG4697を、例1のtTAを産生する10のクローンのうち1つにトランスフェクトする。その細胞は、E1機能を相補して、しかもORF6および7の発現を活性化してウイルス粒子の形成を行わせるtTAを産生することができる。次いで0.1～1.00で様々に変わる特定のm. o. i. (感染多重度)で標的細胞を感染させることができるストックを作り出す。

例2: E1およびE4機能のための相補系4677の構築であって、E4の発現はtTAで誘導しうる

この例では、tetOの7コピーにより先行された最小プロモーターのコントロール下におかれたE4のORF6および7の発現のためのベクターによる

293細胞のトランスフェクションから作製された相補系に関する。トランスフェクトされた細胞は、E1機能を構成的におよびE4機能をtTA誘導で相補することができる。後者は欠陥アデノウイルスベクターまたは慣用的発現ベクターに保有させてもよい。

#### 1. 相補系の構築

pTG4658のXhoI-BamHI断片(“tetO-CMV最小プロモーター-ORF6および7”カセットを保有する)を選択ベクターpTG6529のSalIおよびBglII部位間に挿入して、pTG4677を得る。60の耐性クローンを293系へのトランスフェクションとプロマイシン選択後に得た。相補について最良の能力を示すクローンは異なる手法で調べてもよい。

第一の方法では、tTAを構成的に発現するプラスミドpUHD15-1を一時的にトランスフェクトさせる。適切な抗体を用いた細胞抽出物のウェスタンブロット分析では、これらのクローン中で産生されるORF6および/または7ポリペプチドの量と、ひいてはE4アデノウイルス機能をトランス相補するそれらの能力について評価することができる。もう1つの方法によれば、tTAを発現

する欠陥アデノウイルスも用いてよい。この方法は以下で詳述されている。

## 2. tTAを構成的に発現する欠陥アデノウイルスの構築

2シリーズの構築を行った。E1およびE3領域の大部分が失われたアデノウイルスゲノムに相当して、E1領域の代わりにtTA (CMVプロモーター) の構成的発現用のカセットを含んだpTG4682。加えて、E4領域はpTG4683から欠失させる。

出発物質は、アデノウイルスゲノムの5'末端の部分、即ちヌクレオチド1-458および3328-5788にわたる配列のpポリII (Lathe et al., 1987, 前掲) 中への挿入から得られるベクターpTG8343である (図4)。

BglIIによるpTG8343の切断とKlenow断片での処理後に、ベクターを

CMVプロモーターとその後にtTA配列を保有したpUHD15-1のSspI-HpaI断片と結合させる。相同的配列を保有したアデノウイルスベクターとの相同的組換えによるtTAカセットの挿入を行うためのpTG4674を得る。この目的から、Ad5の5' ITRおよびエンキャプシデーション配列 (nt 1-458)、E1領域の代わりにLacZ遺伝子の発現用カセットと、E3領域が失われた残りのアデノウイルス配列 (ヌクレオチド3329-27870および30749-35935) を含んだベクターpTG4662 (図5) を選択する。

E.coli株BJをClaIで直鎖化されたベクターpTG4662と、SgrAIおよびBstEIIで開裂されたpTG4674で同時形質転換させて、pTG4682を得る (図6)。この相同的組換え現象では、pTG4662のLacZカセットからpTG4674から得た断片により保有されるtTAカセットへの交換を行う。

ベクターpTG4683 (図7) は、ClaIで開裂されたpTG4663とSgrAIおよびBstEIIで切断されたpTG4674との間でin vitro相同的組換えにより、同様の技術に従い得る。ベクターpTG4663は、E4領域の大部分 (ヌクレオチド32994-34998) が失われているという事実を除いて、pTG4662と同様である。

### 3. tTAを誘導的に発現する欠陥アデノウイルスの構築

tTA配列の発現をモニターするために、系を自己誘導性にする、5'末端にtetO配列の7コピーを含んだCMV最小プロモーターを利用する。実際には、未誘導プロモーターからのいくつかのtTA分子の産生がその系を活性化させる。前記のように、E4領域が失われたかまたは失われていない2つのアデノウイルスベクターpTG4684およびpTG4685を作製する。

pUHD15-1のCMVプロモーターをXhoI-EcoRI断片の形で

pUHD10-3から単離されたその調製しうるホモログと交換する。pTG4659が得られる。そのカセットをSspIおよびHpaI切断により後者から単離し、BglIIで直鎖化されたベクターpTG8343中にクローニングし、Klenow断片で処理して、pTG4675を得る(図8)。次いでE.coli株BJをSgrAIおよびBstEIIで処理された上記ベクターと酵素ClaIで直鎖化されたpTG4662またはpTG4663で同時形質転換させて、相対的組換えによりウイルスベクターpTG4684(図9)およびpTG4685(図10)を得る。

ウイルス粒子は、テトラサイクリンの不在下で例2.1の場合のように適切な細胞系の簡単なトランスフェクションにより得てもよい(tetO配列により調節しうるtTRとORF6および7の転写に阻害効果を有する培地への抗生物質の添加)。

### 4. マイクロインフェクションおよび微量滴定の機能性試験

実験は、E1機能を補う293細胞とE1およびE4機能を補う1653細胞で並行して行う。細胞を約 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルのベースで培養プレートに分配させる。次いでそれらを試験されるベクターpTG4682~4685でトランスフェクトさせる。双方の細胞タイプでプラークを形成する(それらの出現率による)それらの能力とそれらのサイズを評価する。コントロールとして、第一世代アデノウイルスベクター(E1およびE3の欠失)と第二世代アデノウイルスベクター(E4の追加欠失)に各々相当するが、tTAを発現しない組換えベクターpTG4662およびpTG4663を用いる。

p.TG4662からウイルス粒子の生成は双方の細胞系で容易に検出する（大きなプラークの形成が急速に出現する）。p.TG4663はその面についてE1およびE4を補う1653細胞だけで増殖させることができ、後で出現する小さなプラークを与える。

ベクターp.TG4682およびp.TG4684に関しては、293および1653細胞中へのそれらのトランスフェクションと、その後の大きな容易に同定するプラークの形成は速やかである（p.TG4662コントロールと似た挙動）。E4領域が失われたベクターp.TG4683およびp.TG4685はp.TG4663に匹敵した挙動を示し、1653系だとウイルス粒子はゆっくり出現して小さなサイズのプラークを形成するが、293系だとプラークは検出されない。これらのデータは、tTAの発現がウイルス増殖に不利でないか、または細胞増殖に有害でないことを示しているようである。

上記のように、この技術は例1の系（293/p.TG4673）とベクターp.TG4696およびp.TG4697に適用してもよい。

例3：E1およびE4機能に関する相補系5606の構築であって、E4の発現は系により産生されるtTAで誘導しうる

この例では、7つの連続的tetO配列を5'末端に伴うCMV最小プロモーター（転写開始部位に対して-53位）に相当する、pOMV\*と以下で称されるプロモーターのコントロール下におかれたORF6/7およびtTAをコードする配列をpac選択遺伝子以外に保有したベクターp.TG5606での293細胞のトランスフェクションにより得られる、E1-およびE4-欠陥アデノウイルスの増殖を行える相補細胞系について記載している。この自己誘導系では、tetO配列でポジティブに作用して、欠陥ベクターの有効な相補のために十分な量でそれら自体の合成とORF6/7産物の合成とを増幅させることができる、最小CMVプロモーターからのいくつかのtTA分子の産生をまず第一に可能とする。

#### 1. プラスミドp.TG5606の構築

第一工程ではベクターp.TG4688を構築するが、これはHpaiおよびP

v u I で開裂された p T G 4 6 7 3 (例 1. 1) から精製されたカセット (CMV プロモーター/エンハンサー - t T A) の、これらの同酵素で切断されたベクター p T G 4 6 7 7 (例 2. 1) 中へのクローニングから得る。ベクター p T G 5 6 0 6 は、調節しうるプロモーター p C M V\* による CMV プロモーター/エンハンサーの置換により、上記ベクターから得る。このために、p T G 4 6 8 8 を酵素 S c a I - X b a I で直鎖化してから、p T G 4 6 5 9 から単離された p C M V\* を保有する S c a I - X b a I 断片を挿入する。こうして作製されたプラスミド p T G 5 6 0 6 (図 1 1) は下記 3 つの発現カセットを含んでいる:

p C M V\* プロモーター、t T A トランスアクチベーターをコードする配列および S V 4 0 ウイルスポリ A 配列から構成される第一カセット、

初期プロモーターのコントロール下にあるプロマイシン耐性遺伝子 (p a c 遺伝子) および S V 4 0 ウイルス p A 配列から構成される第二カセット、および

p C M V\* プロモーターと、その後に自己のポリ A シグナルを伴うアデノウイルス 5 O R F 6 / 7 をコードする配列から構成される第三カセット。

## 2. 相補系 5 6 0 6 の作製

$4 \times 10^6$  293 細胞 (ATCC CRL 1573) を 10% FCS の存在下で DMEM 培地 (Dulbecco 改変 Eagle 培地) で培養する。約 70~80% 集密率で、それらをいくつかの皿に分配し、その後 10  $\mu$ g または 20  $\mu$ g のプラスミド p T G 5 6 0 6 でトランスフェクトする (Gibco-BRL トランスフェクションキット; レファレンス 530-8120 SA)。48 時間後、細胞を選択培地 (第一週目はプロマイシン 0.7  $\mu$ g/ml、その後 1  $\mu$ g/ml) で培養する。耐性クローンを上記選択培地で、適宜にテトラサイクリンの存在下において増幅させる。後者は t e t O 配列でリプレッサー効果を発揮し、それを加える目的は O R F 6 / 7 の発現産物の合成を減少させることであり、それは細胞毒性があつて細胞死を導くことがある。このため、3 つのバッチを各々 0  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml および 5  $\mu$ g/ml で培地中に含有されたテトラサイクリン濃度に従い作った。多数のクロー

ンがトランスフェクトされた DNA の量と培養条件にかかわらず出現する。

E1およびE4遺伝子を同時発現するクローンは、マイクロインフェクションおよび微量滴定技術によりスクリーニングした。約100の5606クローンをE1-E4欠陥アデノウイルスベクターにより低いmoi（感染多重度）で感染させる（例えば、国際出願WO94/28152参照）。細胞変性効果は、それらを得られたバッチに応じて、それらの10～16%について感染から48～72時間後に観察される。細胞変性効果は二重欠陥ウイルスの増殖の証拠であり、トランス相補に関するクローンの能力を反映している。感染性ウイルス粒子の力価は許容細胞でマイクロウェル滴定技術により評価する。このために、ウイルス粒子を3サイクルの凍結-解凍により感染培養物から回収し、滴定されるウイルス上澄を100μl/ウェルのペースで連続希釈して、 $4 \times 10^4$  1653細胞と接触させておく。ウイルス力価は異なる希釈倍率で細胞変性効果の観察によりおおまかに評価する。最も生産的な5606クローン（高希釈倍率で細胞変性効果）をpfu/mlおよびifu/mlで収率の更に正確な研究のために選択する。

選択された5606クローン（ $5 \times 10^5$ 細胞）を培養し、E1-E4アデノウイルスベクターで再び感染させる。例えば、E1、E3（nt 28592-30470）およびE4（nt 32994-34998）領域が失われて、E1の代わりに対象遺伝子の発現用カセット、MLP-LacZプロモーターおよびMLP-CFTR遺伝子プロモーターを各々含んだベクターAdTG8595およびAdTG4651を用いることが可能である。前記のように、ウイルス上澄を回収し、許容細胞（系1653または5606生産クローン）を適切な希釈倍率のウイルス上澄で感染させて、寒天中で溶解ブランクをカウントすることにより力価pfu/mlを調べる。#5-19/1および#5-38と称される2つのクローンは $1 \sim 5 \times 10^9$  pfu/mlの力価を示す（滴定はそれら自体で行う）。感染性粒子の収率（ifu/ml）は対象遺伝子を発現する感染細胞をカウントすることによ

り評価する。このため、AdTG8595で感染された5606クローンから得られるウイルス上澄をそれら自体で滴定し、感染から48時間後に付着細胞を（2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含有したPBS緩衝液）固定し、β-ガラクトシダーゼの産生を色素X-Gal（5mMフェリシア

ニドK、5 mMフェロシアニドKおよび2 mM  $MgCl_2$ が加えられたPBS緩衝液中(1 mg/ml)で視覚化させる。得られた力価は $10^{10}$ および $10^{11}$  ifu/mlである。

最後に、後期ウイルス遺伝子の発現は損われないことが確認されるが、それはウイルス粒子のアセンブリーの欠陥を生じることがあるためである。ファイバーおよびペントンの産生は、凍結・解凍のサイクル後に回収された感染細胞のペレットについてウエスタンブロッティングにより調べる。分析はファイバーに対する抗体(Henry et al., 1994, J. Virol. 68, 5239-5246)またはペントンベースに対する抗体(Boulanger et al., 1973, Eur. J. Biochem. 39, 37-42)とその後にペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体(Amersham, NA 934)を用いて3  $\mu$ gのタンパク質に相当する細胞抽出物の一部で標準技術に従い行う。視覚化はECL検出キット(Amersham, RPN 2106)を用いて行う。そのデータでは、2つの5606クローンから得られるE1-E4アデノウイルスがE1-ウイルスで感染された293細胞で得られる場合に近いレベルで後期タンパク質を産生することができることを示している。

結論として、5606クローン#5-19/1および#5-38は $1 \times 10^9$  pfu/mlを超える力価、大規模産生に匹敵する力価で二重欠陥ベクターを増幅させることができるE1およびE4相補系である。

例4：E1およびE2A機能に関する相補系9579の構築であって、E2Aの発現はtTAにより誘導できて、後者はその系により産生される

この例では、前例と同様の原理に従いDBPタンパク質の自己誘導性発現を行うベクターpTG9579での293細胞のトランスフェクションにより得られる、E1-およびE2A-欠陥アデノウイルスの増殖を行える相補細胞系について記載している。

#### 1. ベクターpTG9579の構築

ベクターpTG9579を下記のように構築する：

アデノウイルス5ゲノムの3'末端をDraI-BsmBIで切断されたゲノムDNAの作製から単離する。対応する断片をベクターpUC19 (Gibco BR

mM Tris-HCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、5mM KCl、15.0mM NaClおよび1% Triton X-100)で処理して、タンパク質を溶解させる。タンパク質抽出物7 $\mu$ lを5% $\beta$ -メルカプトエタノール含有Tris-グリシン添加緩衝液に溶解させ、変性条件下で8~16%PAGE電気泳動に付す。ニトロセルロース膜へのトランスファー後に、DBPタンパク質をウエスタンブロッティングによりアデノウイルスDBPタンパク質に特異的な抗体(Reich et al., 1983, Virology, 128, 480-484; 例えばマウスモノクローナル抗体 $\alpha$ 72KB6-8)およびペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウス免疫グロブリン抗体(Amersham; NA 931)を用いて視覚化させる。視覚化はECLキット(Amersham, RPN 2106)で行う。図12で示された結果は、発現がテトラサイクリンの存在下で減少されることから、調節しながら、DBPタンパク質がベクターpTG9579で一時的にトランスフェクトされた293細胞で産生されることを示している。

## 2. 相補系9579の作製

20 $\mu$ gのプラスミドpTG9579を用いて $3 \times 10^6$ 293細胞をトランスフェクトする(Gibco-BRLトランスフェクションキット; レファレンス530-8120SA)。クローンをG418 600 $\mu$ g/mlおよびテトラサイクリン1 $\mu$ g/mlの存在下で選択し、上記ウエスタンブロッティング技術によりDBPタンパク質を産生させるそれらの能力について試験する。それらのうち20%はデキサメタゾンの存在下でgmDBP6系で得られる場合に近いレベルで検出可能な量のDBPを発現し、そのうち2つは#7-44および#7-32と称される。後者の系はE2A機能の相補のためのレファレンス系である(Brough et al., 1992, Virol. 190, 624-634)。それは、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーターにより指図される、DBPをコードする配列を含んだ発現カセットでトランスフェクトされたHeLa細胞に由来している。

DBP陽性クローンを培養し、E2A機能に欠陥があるアデノウイルスH5d1802によりmoi $\geq$ 1で感染させる(Rice and Klessig, 1985, J. Virol. 56, 767-778)。感染から2日後に、ウイルス上澄を凍結-解凍の連続サイクルによ

L) のSma I 部位中にサブクローニングして、中間ベクターpTG9568を得る。DBP配列の停止コドンはDra I 開裂で壊れていることがわかっている。それは、ゲノム鋳型と適切なプライマーからPCR増幅により得られた正しい配列を含む断片の、pTG9568のEcoRVおよびBamHI 部位間での導入により修復する。pTG9571を得る。

別に、ベクターpUHD10-3をHind IIIで直鎖化し、Klenow断片で処理し、初期プロモーターにより指示されるneo遺伝子 (Colbere-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol., 150, 1-14) の発現用カセットとSV40 pAシグナルを挿入する。こうして得られたベクターpTG9555をXba Iで直鎖化し、その後Klenow断片の作用に付してから、Xho IおよびEcoRIでの開裂とKlenow断片での処理後にpTG9571から単離されたDBP配列を保有した断片をクローニングする。最後に、tTA遺伝子の発現用カセットを保有したpTG4659から単離されたHpa I - Xho I断片 (Klenow) を、先の工程で作られたベクターpTG9577の、Klenow断片で処理されたXho I 部位中に導入する。要約すれば、後者は：

pCMV<sup>\*</sup>プロモーターと、その後にtTAトランスアクチベーターをコードする配列とSV40ウイルス ポリA配列から構成される第一カセット、初期プロモーターのコントロール下にある抗生物質G418耐性neo遺伝子とSV

40ウイルスpA配列から構成される第二カセット、および

pCMV<sup>\*</sup>プロモーターのコントロール下にあるアデノウイルス5DBPタンパク質をコードする配列とSV40ウイルスpA配列から構成される第三カセット

を含んでいる。

pTG9579による機能性DBPタンパク質の産生は、293細胞中への一時的トランスフェクションにより確認してもよい。簡単に言えば、 $1 \times 10^6$ 細胞をリン酸カルシウム法により5  $\mu$ gのベクターでトランスフェクトし、その後テトラサイクリンの存在下 (1  $\mu$ g/ml) または不在下で培養する。トランスフェクトから4日後に細胞を回収し、細胞ペレットを100  $\mu$ lの溶解緩衝液 (50

る細胞の溶解後に集め、連続希釈して、許容系 gmDBP6 で滴定する。ウイルス粒子の存在はクローン #7-44 および #7-32 から得られた上澄で観察され、E2A 機能を補うそれらの能力について示している。同タイプの実験をベクター pTG9542 (E1 (LacZ)、E2A および E3) で行う。感染性粒子が産生され、これら2つのクローンが二重欠陥ベクターを増殖および増幅させうることを示している。更に、これらの粒子は293系で増殖できないため、E2A 表現型と復帰変異体の不在を確認できる。

AdTG9542 ウイルスで感染されたクローン #7-44 で行われた増幅実験では、滴定が感染から4日後に行われたとき、約125倍の増幅率を示した。

【图1】

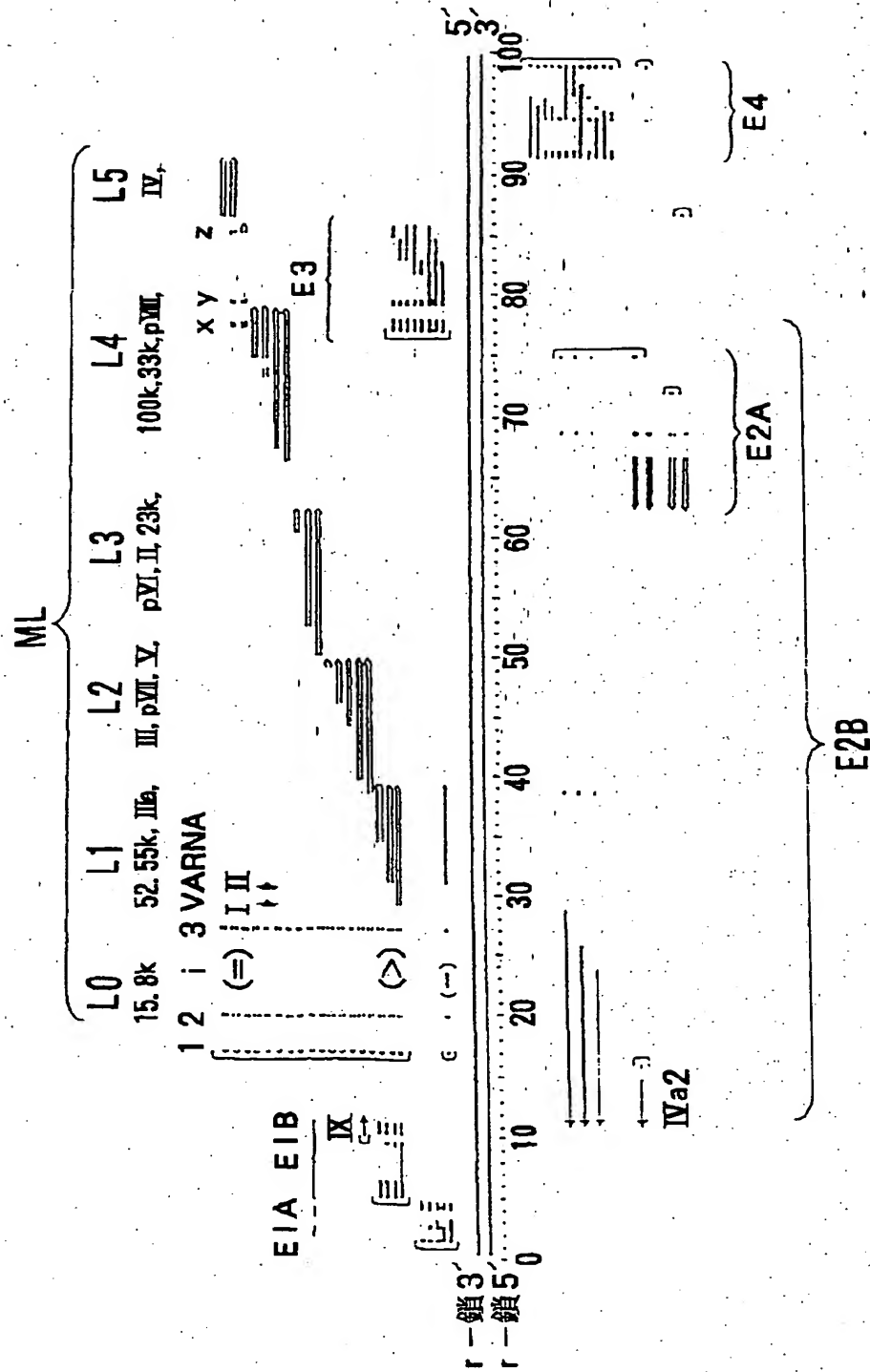


FIGURE 1

【図2】

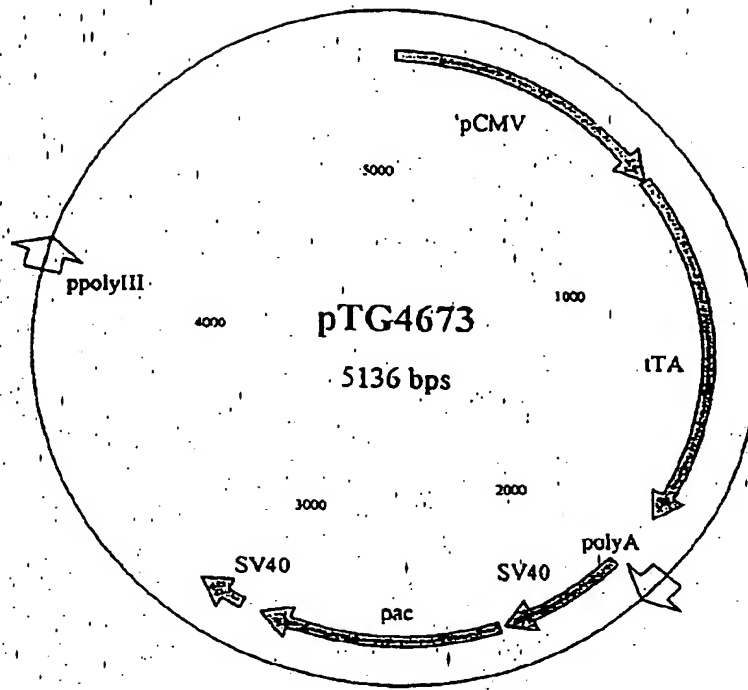
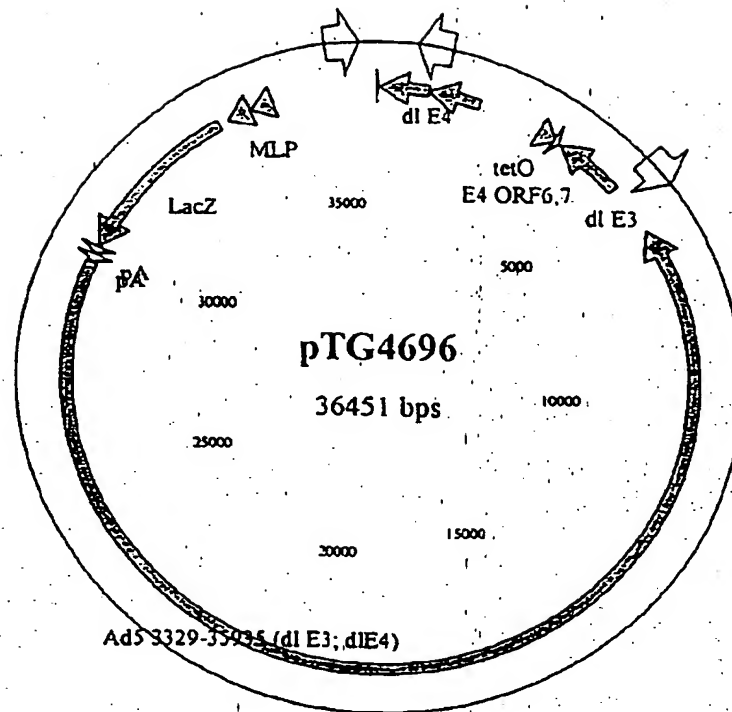


FIGURE 2

【例 3】



【図4】

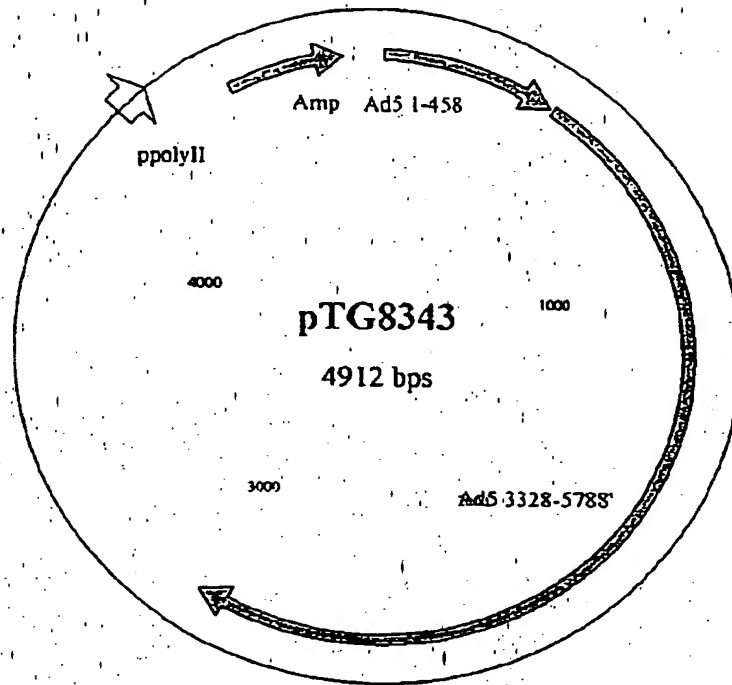


FIGURE 4

【图5】

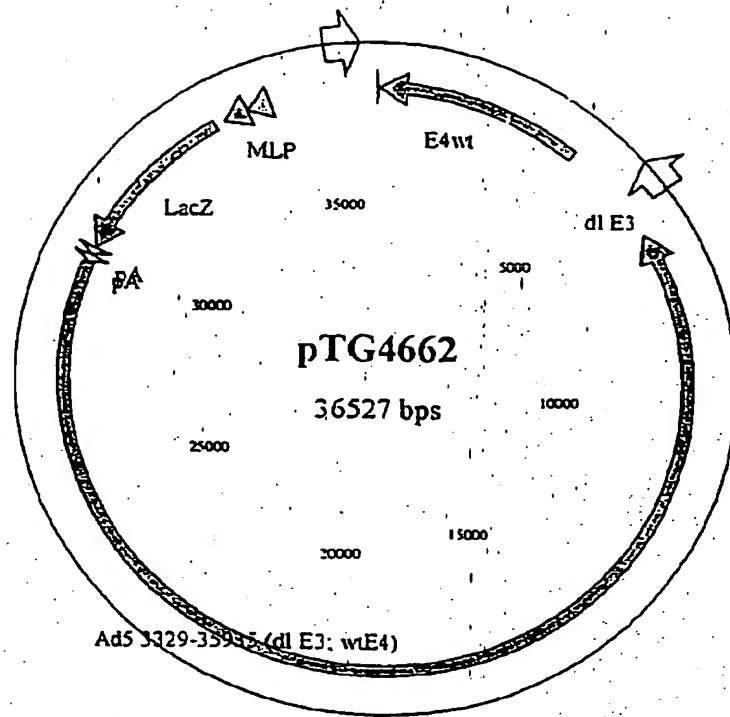


FIGURE 5

【図6】

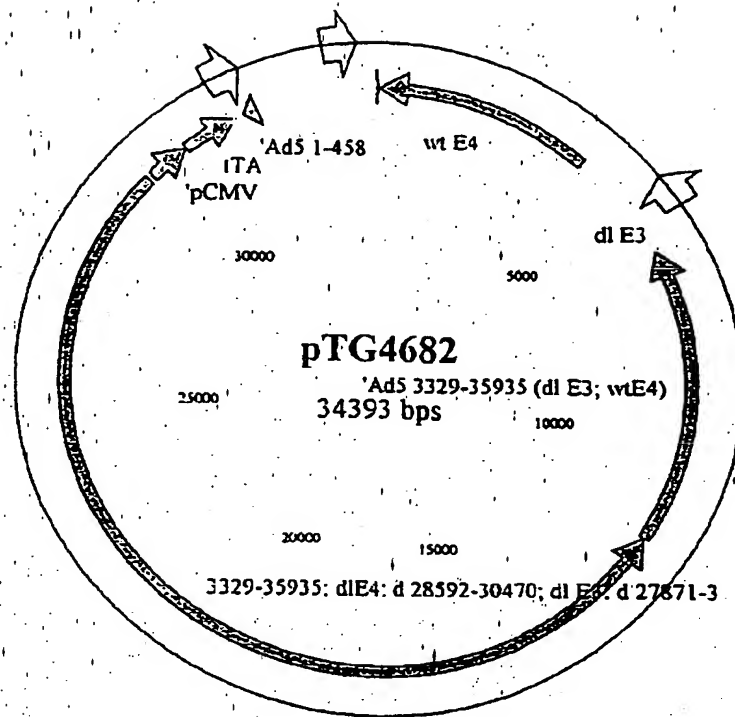


FIGURE 6

【図7】

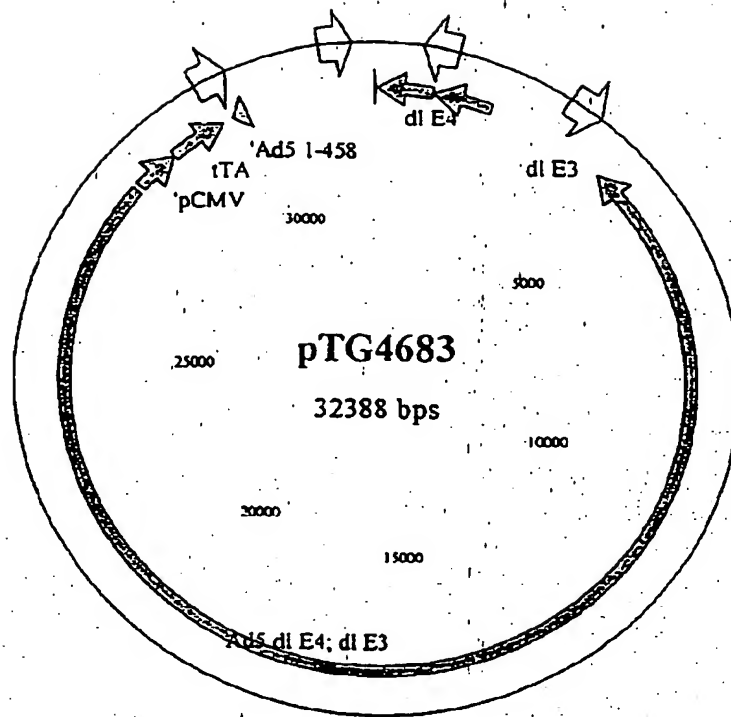


FIGURE 7

【图8】

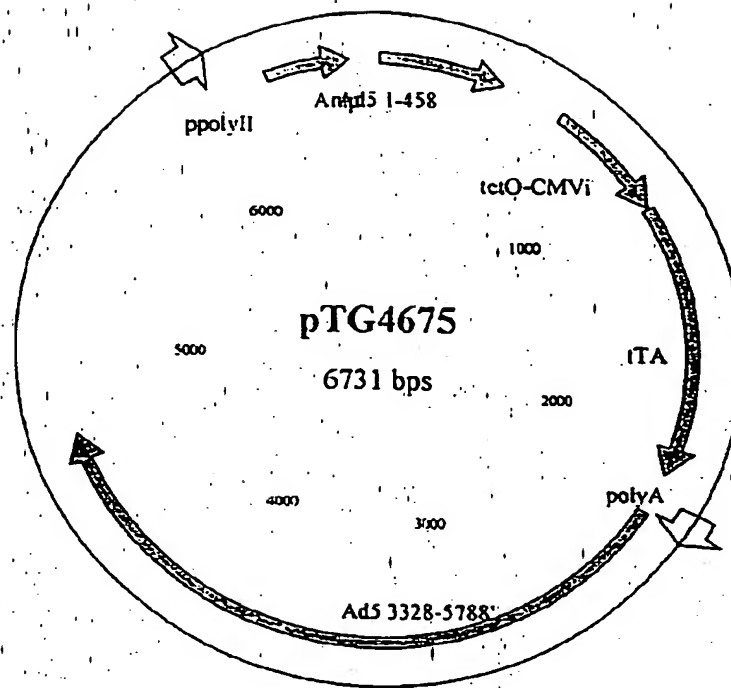


FIGURE 8

【图9】

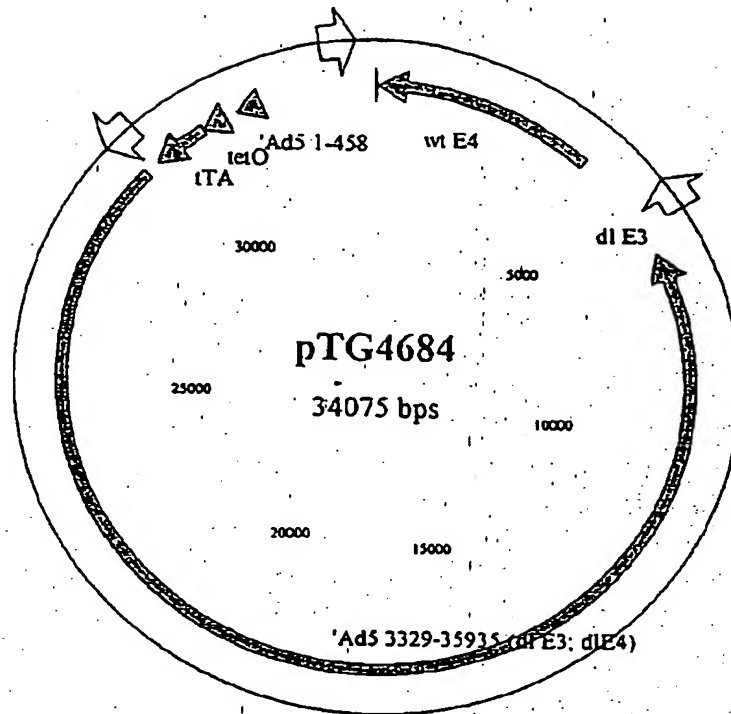


FIGURE 9

【図10】

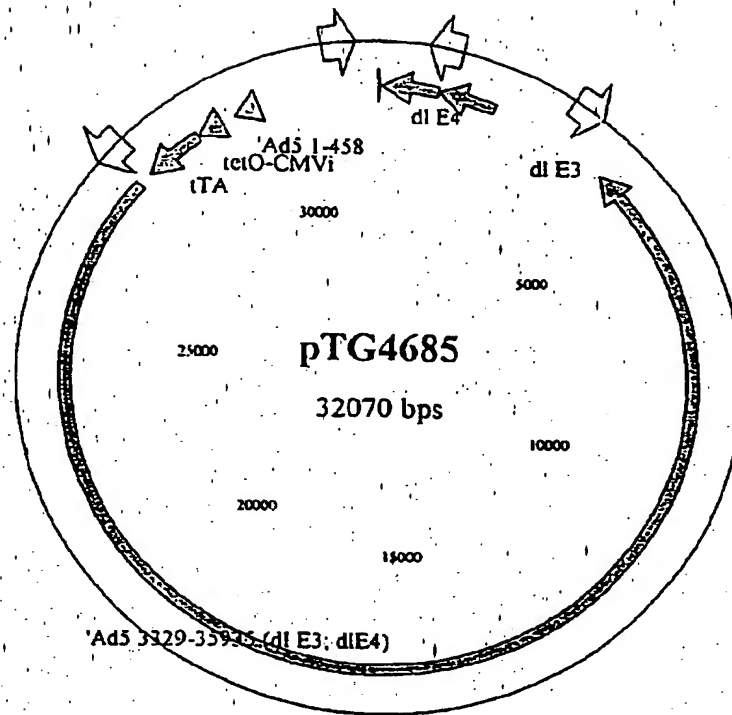


FIGURE 10

【図11】

pTG 5606

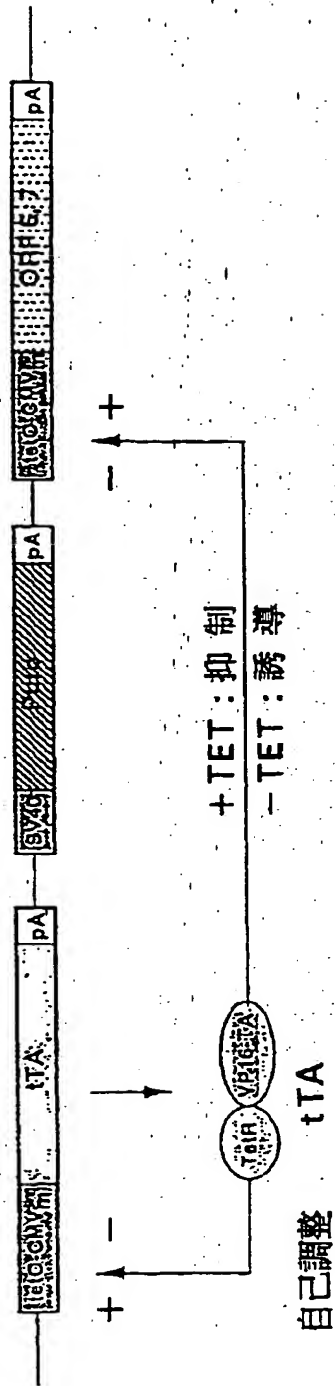


FIGURE 11

【図12】

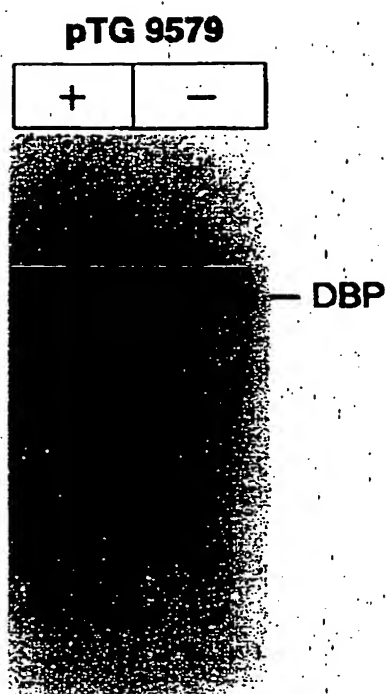


FIGURE 12

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 96/01165	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K48/00 A61K39/235	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
Y	GENE THER, MAR 1995, 2 (2) P124-315, ENGLAND, XP000568345 HERSH J ET AL: "Modulation of gene expression after replication-deficient, recombinant adenovirus-mediated gene transfer by the product of a second adenovirus vector." see the whole document
Y	WO, A, 94 28152 (TRANSGENE SA ;IMLER JEAN LUC (FR); METHALI MAJID (FR); PAVIRANI AN) 8 December 1994 cited in the application see page 12, line 21 - line 34 see page 15, line 20 - page 16, line 5 --- -/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 November 1996	06.12.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5118 Patendlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Gurdjian, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/FR 96/01165

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J VIROL, APR 1995, 69 (4) P2565-73, UNITED STATES, XP002002114 KIM HJ ET AL: "Tetracycline repressor-regulated gene repression in recombinant human cytomegalovirus." cited in the application see the whole document ---	5-7,13, 21,22,30
Y	WO, A, 95 02697 (RHONE-POULENC RORER SA; PERRICAUDET MICHEL (FR); VIGNE EMMANUELLE) 26 January 1995 see claims 19-25; examples 4,5 ---	1-38
Y	MOL. CELL. BIOL. (APR 1995), 15(4), 1907-14 CODEN: MCEBD4; ISSN: 0270-7306, XP000564650 DEUSCHLE, ULRICH ET AL: "Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters" see the whole document ---	22,23,30
Y	NUCLEIC ACIDS RES. (1991), 19(23), 6579-86 CODEN: NARHAD; ISSN: 0305-1048, XP000604601 O'CONNOR, ROBERT J. ET AL: "The C-terminal 70 amino acids of the adenovirus E4-ORF6 / 7 protein are essential and sufficient for E2F complex formation" see the whole document ---	25
Y	VIRUS GENES (1990), 4(1), 53-61 CODEN: VIGEET; ISSN: 0920-8569, XP000577713 ROOVERS, DICK J. ET AL: "Physical mapping of two temperature-sensitive adenovirus mutants affected in the DNA polymerase and DNA binding proteins" see the whole document ---	27,28
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1994, 14, 8166-817 - 0270-7306, XP000568381 SHAN B ET AL: "DEREGULATED EXPRESSION OF E2F-1 INDUCES S-PHASE ENTRY AND LEADS TO APOPTOSIS" see the whole document ---	5-9,13, 21,22,30
A	JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 1994, 93, 1864-1868, XP000568358 FISHMAN GI ET AL: "TETRACYCLINE-REGULATED CARDIAC GENE-EXPRESSION IN-VIVO" see the whole document ---	5-9,13, 21,22,30
	---	

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.  
PCT/FR 96/01165

C(Compulsory) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	HUMAN GENE THERAPY, 1995, 6/12 (1575-1586), USA, XP000568394 KROUGLIAK V. ET AL: "Development of cell lines capable of complementing E1, E4, and protein IX defective adenovirus type 5 mutants" see the whole document ---	1-4, 8-12, 14-20, 24-29, 31-36
T	CANCER GENE THER., 1995, XP000568385 WANG Q ET AL: "A new packaging cell line for propagation of the second generation of the recombinant adeno virus vector" see the whole document -----	1-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-A- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7589616	26-10-95
-----			
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664	20-01-95
		FR-A- 2718749	20-10-95
		AU-A- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		HU-A- 72558	28-05-96
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NQ-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		SK-A- 31295	08-05-96
		ZA-A- 9405012	20-02-95
-----			

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L  
U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, S  
G, US

**\* NOTICES \***

**Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.**
- 2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.**
- 3. In the drawings, any words are not translated.**

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]**

The virus vector for gene therapies, and network About the new virus vector to which this invention makes transfer and manifestation of an object gene perform with a host cell or a living body, although the manifestation of the virogene is functionality in a complementary cell, it is adjusted so that it may not be functionality with a host cell or a living body. This invention relates also to the approach for producing the cell containing these new vectors, and the infectivity virion for a therapy. Especially this invention is very important about the prospect of the gene therapy in Homo sapiens.

Possibility of treating a Homo sapiens disease by gene therapy has changed from the phase of theoretical consideration to the phase of clinical application in several years. The first protocol applied to Homo sapiens is the patient who had immune disorder hereditarily as a result of the variation which affects the gene which carries out the code of the adenine deaminase (ADA), and was started in the U.S. in September, 1990. Development of a gene therapy protocol with new about various genes or acquired diseases (infection disease and virus disease like especially an acquired immunodeficiency syndrome, or cancer) having said comparatively well in this first experiment was urged. In a large majority of protocols indicated until now, a therapy gene is moved to the cell which should be treated, and in order to make it discover there, the virus vector is used.

The place to current, although the retrovirus vector is most widely used for the simplicity of these genomes, the number of them is one. However, they are mainly infected with a fission cell in one side to which they indicate independently two big faults which restrict those systematic use to be those limited capacity about cloning, and the risk of the insertion mutagenesis cannot be disregarded as a result of those random nests by the genome of a host cell on the other hand. From this reason, many research teams are making an effort to develop the vector of other types, and what originates at adenovirus, an adeno-associated virus (AAV), a cytomegalovirus, poxvirus, and a Herpes virus is mentioned in it. Speaking generally, those organizations' and those infection cycles' being indicated by the detail by the reference which may come to hand to this contractor.

In this relation, it was concluded that use of an adenovirus vector was the promising

substituting method. Although adenovirus is proved by many animal species, it has a large host range, it hardly has virulence and the fault accompanying a retrovirus is not shown, they are non-nest nature and the reason is reproduced also by the resting cell. Those genomes consist of a straight chain double-stranded-DNA molecule of about 36 kbs which held the both sides of about 30 or more genes, an early gene required for virus replication, and an anaphase structural gene for reference (refer to drawing 1 ).

An early gene is divided into four fields which spread in an adenovirus genome (E1-E4; E expresses the first stage). They have the promotor of these very thing including six transcription units. The late gene (L1-L5; L expresses an anaphase) overlaps the initial transcription unit and the partial target, and is imprinted from main late promoters (MLP) about almost all parts.

All the adenovirus vectors used by current and the gene therapy protocol lack most E1 fields indispensable to a duplicate, in order to avoid those diffusion with an environment and a host object. Especially those parts contain additional deletion in un-indispensable E3 field to which those cloning capacity can be made to increase. An object gene is introduced into a viral DNA instead of one or other deletion fields. The deletion of E1 field makes a viral genome what has a defect in a duplicate. however

It increases by the complementary cell lineage which supplies ability by in trans. 293 systems (Graham et al., 1977, J.Gen.Virol., 36, 59-72) made from the Homo sapiens germ kidney cell with which E1 function is compensated effectively are used regularly. E3 field is not indispensable and does not need to be compensated.

Although the operability of the gene transfer using these first generation vector is well established by current, the problem of those safeties is still unsolved. Those toxic problems arise apart from a safety aspect (risk which makes RCA, i.e., a duplicate competent particle). In fact, the first clinical trial expressed induction of an inflammatory response by the host with the manifestation of virogene.

The second generation adenovirus vector was announced by reference recently. They have left the in cis field (ITR and en KYAPUSHIDESHON array) required for the duplicate of a virus at an infected cell, and are in vivo. It has substantial internal deletion in order to lose the great portion of virogene which is not expected a manifestation. However, these vectors of the advanced technology have some faults which restrict those activities on industrial level. It is required to actually compensate a comprehensive deletion function and to have satisfactorily the new network which can produce virion with a high potency. In practice, it is difficult for such a network especially to make about the proliferation potential force and yield of virion, for the cytotoxicity of an adenovirus gene, in order to be best.

These faults can be corrected in this invention. Although the new network which originates in 293 systems with which E1 and E2, or E4 adenovirus function is compensated for magnification of an idiomatic second generation adenovirus vector on the other hand was

built, in the network, the manifestation of E2 or E4 field is directed by the promotor accompanying 5' end for the so-called "operator" array of the bacteria tetracycline operon, and these arrays are called tetO below. Composition of a correspondence manifestation product is activated only under existence of the inducer in which it is produced by an adenovirus vector or its network itself, and deals. Similarly, repressor is added to a culture medium, when complementation is not desired any longer.

On the other hand, the new adenovirus vector by which most E1 and E3 fields were lost is produced here, the transcription unit of a residual virus field (E2, E4, and/or L1-L5) makes those manifestations perform, when infectivity virion is produced in the vector, and it can be adjusted in order to check it by the host cell further. Accommodation is performed by the tetO array in a next example. In those insertion by the side of 5' of a TATA box, although the base-line level of an imprint is min, the promotor strongly stimulated under existence of the above-mentioned inducer is produced. For this reason, production of virus protein is activated by 293 systems which discover the inducer in which is made to form infectivity virion and it deals. On the contrary, if it is the infection host cell which does not produce the inducer of the source of bacteria by nature, it will decrease remarkably. Accommodation of virogene does not have effectiveness in the manifestation of an outpatient department nucleotide sequence put under control of the promotor who does not answer a tetracycline. Although the adenovirus vector of this invention provides use of the vector of the advanced technology with advantageous approach to the fault of a proper, the reason is that they have the safety of use, and the ease of production. on the other hand, they are increased by the idiomatic complementation system with the high potency corresponding to the demand on industry -- having -- another side -- them -- an outpatient department nucleotide sequence -- in vivo It moves, and it can be made stably discovered, restricting adverse reaction (inflammatory response in a host). They are most suitable for the human gene therapy especially.

Therefore, the theme of this invention is a virus vector characterized by including the manifestation unit with one or more virogenes, and although the above-mentioned manifestation unit is functionality in a complementary cell, it is not functionality in a host cell. For the purpose of this invention, a "virus vector" is obtained from the parent virus with which the genome was embellished. These qualification is various (the deletion of one or more nucleotides, variation, and/or addition), and is located in the coding region of a viral genome, and outside these fields (for example, the inside of promoterregion). It is replaced with the outpatient department nucleotide sequence which it makes into non-functionality whether to make a part of virus arrays lose for reference, or is asked for other arrays, especially a manifestation by the host cell.

The virus vector by this invention is guided from various viruses like a Herpes virus, a cytomegalovirus, AAV (adeno-associated virus) and poxvirus especially a vaccinia, TORIPOKKUSU, or canary poxvirus. Such vectors and those production techniques are known by this contractor.

However, the suitable vector is an adenovirus vector especially for this invention. It is guided from the hybrid which contained the adenovirus genome fragment of the different origin from the adenovirus of Homo sapiens, a dog, a cat, a cow, a rat, a sheep, a bird, or the ape origin. The Bad type 3 (Zakharchuk et al., 1993, Arch.Virol., 128,171-176;Spibey and Cavanagh, 1989, J.Gen.Virol., 70,165-172;Jouvenne et al., 1987, Gene, 60, 21-28;Mittal et al., 1995, J.Gen.Virol., 76, 93-102) of the cow origin is mentioned instead of DAV of adenovirus CAV-1 of the dog origin or CAV-2, and the cat origin still more concretely, however – desirable – a human serum protein type C – the adenovirus vector (Graham and Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol.7, p 109-128;Ed:E.J.Murray, The Human Press Inc.) of 2 or the human adenovirus origin of 5 folds is preferably desirable absolutely.

The advantageous mode of this invention consists of a vector which one or more virogenes required for a duplicate are lost, or is made into non-functionality and which has a defect in a duplicate. Such a vector that cannot be replicated autonomously is increased in a complementary cell. The vocabulary a "complementation cell" expresses the cell which can supply the function which has a defect in the vector by this invention by in trans. If it puts in another way, although it cannot be produced itself, it can produce required for duplicate and an KYAPUSHIDESHON of above-mentioned vector required for formation of infectivity virion protein, first stage, and/or anaphase protein. If it explains, since the desirable adenovirus vector by this invention lacks most E1 fields, a complementary cell like 293 systems which can supply the comprehensive protein by which the code was carried out in E1 field which cannot produce the vector by in trans will be used. It is understood that "infectivity virion" means virion with the capacity for it to be infected with a host cell and to make a viral genome put in there.

According to the desirable mode, the virus vector by this invention is recombinant. For this reason, it includes the outpatient department nucleotide sequence put under control of an element required for that manifestation at a host cell. "Outpatient department nucleotide sequences" are one of the origins, and it is related with the nucleic acid which has a genome relation which is different supposing it does not usually exist in the genome of the parent virus used by this invention or exists. Probably in the relation of this invention, an outpatient department nucleotide sequence will consist of one or more genes, especially a gene for a therapy.

Speaking generally, an outpatient department nucleotide sequence's being able to carry out the code of the antisense RNA and/or mRNA which are translated into target protein later. It consists of a genome type, a complementary DNA (cDNA) type, or a mixed type (mini gene with which at least one intron was lost). It carries out the code of the precursor of maturation protein or maturation protein, especially the precursor which means secretion containing transit peptide. furthermore, all from the protein (nature or edge cutoff protein) with which the product by which a code is carried out is seen by nature, the chimera protein obtained from fusion of the array of another origin to instead of, or the improved variation protein in

which is attained to and/or the changed biological property is shown – or it is a part. Such protein is obtained by the idiomatic technique of molecular biology.

It is advantageous to use the gene which carries out the code of the following polypeptide due to this invention. : - cytokine or lymphokine (interferon-alpha, beta and gamma, interleukin, IL-2, IL-6, IL-10 or IL-12, a tumor necrosis factor (TNF), colony stimulating factors (GM-CSF, C-CSF, M-CSF, etc.);

- cell or nucleus receptor (a pathogen living thing (a virus, bacteria, or parasite), the receptors preferably recognized by the HIV (human immunodeficiency virus), or those ligands);

Protein which participates in - genetic defects (Factor VII, Factor VIII, Factor IX, JISUTO lophine or mini JISUTO lophine, an insulin, CFTR (cystic fibrosis transmembrane transparency regulator) protein, growth hormone (HGF));

- enzymes (an urease, renin, thrombin, etc.);

- enzyme inhibitor (inhibitor of the alpha1-antitrypsin, antithrombin III, and a virus protease etc.);

Polypeptides with the antitumor effectiveness which can prevent partially initiation or advance of - neoplasm or cancer at least (protein which stimulates the inhibitor which acts with an antisense RNA, an antibody, cell division, or a transduction signal, a neoplasm control gene expression product, for example, p53 or Rb, and an immune system);

The protein of - major histocompatibility complex classes I or II, or regulatory protein which acts by correspondence gene expression;

Polypeptides which can prevent - virus, bacteria or the vermination, and/or its advance (the antigen polypeptide and antigen epitope which have immunogenicity, an antibody, transformer dominant variant which can check an operation of natural protein by contention);

- toxins (herpes simplex virus 1 thymidine kinase (HSV-1 TK), a lysine, cholera, or diphtheria toxin) or immunotoxin; it reaches. - markers (a beta galactosidase, luciferase, etc.)

This list is not restrictive and it should be pointed out that other genes may be used.

Furthermore, the outpatient department nucleotide sequence used by this invention may contain additionally the selector genes which can choose or identify the transfected cell. A gpt (xanthin guanine phosphoribosyltransferase) gene is mentioned instead of the neo gene (the code of the neomycin phosphotransferase is carried out) which gives the resistance over an antibiotic G418, a dhfr (dihydrofolate reductase) gene, a CAT (chloramphenicol acetyltransferase) gene, and a pac (puromycin acetyltransferase) gene. Speaking generally, selector genes' being known by this contractor.

It is understood that an element required for the manifestation of an outpatient department nucleotide sequence at a host cell means the comprehensive element which can perform the imprint to RNA (an antisense RNA or mRNA) and the translation in protein from mRNA. Especially in these, a promotor is important. It may be isolated from the gene of an

eukaryon or the virus origin, or compositionality or accommodative are sufficient as it. On the other hand, it may be the natural promotor of the target gene. (It is indicated below). It is also desirable to use a different promotor from what was contained in the unit for the manifestation of virogene. or [ furthermore, / making accommodative the configuration-promotor who improves promotor activity and who loses the field which checks an imprint ] – or you may embellish like introducing the limit part made reverse. For example, HSV-1 A human adenovirus type 2 adenovirus MLP promotor is mentioned especially instead of the promotor of TK, a rat or Homo sapiens PGK (HOSUHO GURICERASE kinase), the alpha1-antitrypsin (liver singularity), and an immunoglobulin (lymphocyte singularity) gene, the initial promotor of an SV40 virus (ape virus 40), and Retrovirus LTR.

Though natural, the outpatient department nucleotide sequence used by this invention can contain an element required for the maintenance instead of [ required for a manifestation at a host cell ] instead of elements (an intron array, a signal sequence, a nuclear localization array, the conclusion array of an imprint, IRES, or translation initiation site of other types) still more nearly additionally. Such an element is known by this contractor.

As mentioned above, although the virus vector by this invention is functionality in a complementary cell, it includes the manifestation unit with the advantageous description that it is not functionality in a host cell which has one or more virogenes. It is understood that "functionality" means the manifestation of virogene covering time amount sufficient in amount sufficient in order to form infectivity virion. It is understood that "non-functionality" means the manifestation of the virogene which decreased as compared with the manifestation level in a parent virus (it is 1/10 or a zero manifestation that it is desirable and few). Although the functional description appears on the occasion of production of the product of the virogene contained per manifestation, it can be proved about these products with the standard technique of molecular biology, immunology, biochemistry, or enzymology. The description of not functioning appears on the bottom of absent of production of a virus product, or the level which decreased on the occasion of production to instead of.

The above-mentioned manifestation unit contains in the advantageous thing one or more different-species regulatory sequences which do not exist in a parent viral DNA. The array which answers the regulator of the repressor type which acts negatively by manifestation, or the inducer type regulator who demonstrates a desirable positive operation may be used. The regulatory sequence used due to this invention may be what kind of the origin of an eukaryon instead of a virus and a prokaryon.

Speaking generally, the regulatory sequence's being indicated by the reference which may come to hand to this contractor. Although the array was embellished to the natural array, it is also possible to use the homologue which demonstrates the accommodation function been [ the function / it ] similar or improved. These qualification is based on addition, the deletion, and/or the permutation of one or more nucleotides.

According to the purpose called for by this invention, a regulatory sequence can adjust the

manifestation of virogene on the stability of different level, i.e., an imprint, expanding, transportation, and mRNA, or the level of the translation to instead of. It may exist in the imprint (if possible non-code) array, when the effectiveness is imprint level (from the upstream of a TATA box, and the latter to less than hundreds of base pairs [ Preferably ]) especially, for example and a promotor or its operation is demonstrated at a next imprint process in various parts of the above-mentioned manifestation unit. 1-25 – advantageous – 1-20 – it is preferably possible 1-10, and to use the regulatory sequence of 1-7 preferably absolutely.

From the purpose of this invention, the vocabulary an "inducer" expresses with other direct or cells or virus factors indirectly a molecule with the capacity which starts or activates the manifestation of the virogene put under control of a regulatory sequence by combining with the above-mentioned regulatory sequence. It can also bar an operation of repressor. By contrast, "repressor" has the capacity which checks or prevents the manifestation of the virogene put under control of the regulatory sequence on which it acts, and this produces it directly or indirectly.

These definitions are explained by the example of the lactose (lac) operon. It combines with the short regulatory sequence called an "operator", and the lacI gene is carrying out the code of the repressor which bars the imprint of the structural gene which carries out the code of the enzyme of the metabolic fate of a lactose by that cause. Since the latter combines with repressor and cannot be combined with an operator any longer under existence of an inducer, it is changed into the inactive form where an imprint cannot be caused.

It is also possible to use these regulators' part or analog in order to improve those effect or to change those singularity (for example, 10 times as effective when checking the imprint from the promotor containing the regulatory sequence guided from the tetracycline operon an anhydro tetracycline as a tetracycline or recently Gossen et al., 1995, Science, 268, the reverse transformer activator indicated by 1766-1769). Furthermore, the regulator used by this invention may be hybrid protein obtained from fusion of the polypeptide of the different origin. Desirable combination consists of a polypeptide (for example, guided from tetracycline repressor (tetR) or the estrogen repressor ER) which can recognize or combine the regulatory sequence used by this invention, and a polypeptide (for example, Gal4 which can interact with a transcription factor or the activation domain of VP16 protein) which can activate a manifestation.

The following table 1 is carried about some of regulatory sequences which can be used due to this invention, and regulators.

---

According to the concrete mode of this invention, the regulatory sequence guided from the bacteria tetracycline operon (tetO) called an "operator" by reference is used. Speaking generally, the code of the tetracycline resistance operon being carried out by transposon Tn10 (Hillen et al., 1984, J.Mol.Biol., 172,185-201). Accommodation is performed by the short nucleotide sequence which is building the bonding site for various regulators and

which is called an "operator" (tetO). For this reason, association of tetracycline repressor (tetR) or an antibiotic tetracycline decreases the level of an imprint remarkably. On the contrary, the activation effectiveness is the reference produced from fusion between the 130 C-terminal amino acid of the activation domain of VP16 protein of a herpes simplex virus, and tetR, and is "tetracycline transformer activator (tTA).

It is obtained by using the protein called ". Gossen and Boujard (1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89, 5547-5551) showed that this regulating system was functionality in an eukaryotic cell recently. the coincidence manifestation of tTA can detect the reporter gene expression put under control of some copies of tetO in the upstream of fundamental imprint arrays, such as etc., about a TATA box and the imprint initiation section, and it is checked by addition of a tetracycline. Kim The group (1995, J.Virol., 69, 2565-2573) uses the tetO array located in the lower stream of a river of a promotor's TATA box about that field, and an imprint is checked by operation of tetR in this case.

In the relation of this invention, although base-line imprint level is very low at nature, the combination "the tetO-minimum promotor" (the direction of 5'→3') to which it carries out raw [ of the promotor who can be activated by Inducer tTA and can control by the tetracycline ] is especially the most desirable. However, it is also possible to use the promotor who a tetO array sets at each latter \*\* instead of 3' side of a TATA box, is controlled by repressor including the array of tetR which recognizes tetO, and gets.

As for the adenovirus vector by this invention, as a desirable modification, it is desirable to consist of a genome of the adenovirus lacking in all or some of E3 fields instead of all or some of E1 field. It is desirable to have stopped advantageously the part of E3 field, especially the part corresponding to the gene which carries out the code of the gp19k (Gooding and Wold, 1990, Critical Reviews of Immunology, 10, 53-71), and although the above-mentioned part is not contained in the above manifestation units, it is put under control of idiomatic congener (E3) or a different-species promotor. It is also obvious that other qualification of a viral genome can be especially performed in E4 or E2 field. It is also advantageous to introduce variation or additional deletion. If this point is explained, temperature sensitivity variation will affect the DBP (DNA-binding protein is expressed) gene of E2 area A (Ensinger and Ginsberg, 1972, J.Virol.10,328-339).

According to the desirable mode, the adenovirus vector by this invention comes to contain a manifestation unit with one or more virogenes of E2, E4, or L1-L5 field.

In the advantageous modification, it has left only the array which carries out the code of ORF 3 and 6 and/or 7 from E4 field (;Ketner et al. which does not take the complementation of E4 function to such limited deletion of E4 field, 1989, Nucleic Acids Res., 17, 3037-3048). It is advantageous to have an adenovirus vector including some manifestation units satisfactorily, and all combination (E2, E4 and E2 and L1-L5, E4 and L1-L5 or E2 and E4, and L1-L5) can be considered. Similarly, the regulatory sequences (for example, TAR, RRE, teto, etc.) which act positively preferably are chosen. The case where the unit holds the same regulatory sequence which can proliferate an adenovirus vector by the

complementation system containing a single inducer from the reason of the simplicity of operation is desirable.

This invention relates also to the eukaryon host cell containing infectivity virion and the virus vector by this invention. Advantageously, it is a human cell preferably and the above-mentioned host cell contains the above-mentioned vector with the mammalian cell, the form included in the genome, or the non-embedded type (episome). There is primary [ of hemopoiesis (a totipotent stem cell, a leucocyte, a lymphocyte, monocyte, or macrophage), muscles, a lung, liver, an epithelium, or the fibrocyte origin ] or a tumor cell in it.

There is a complementary cell in the theme of this invention further, and it is characterized by an inducer and/or repressor (regulator) being included. Even if it adds the latter to a culture medium according to a demand, it may be stably transient and you may make it produce by the cell itself. Preferably, the complementary cell by this invention is changed by installation of the DNA fragment which carries out the code of the above-mentioned regulator. All the standard means for introducing nucleic acids (composition, a virus or a plasmid vector, naked DNA, etc.) into a cell, for example, transfection, electroporation, a microinjection, a RIPOFE cushion, adsorption, and protoplast fusion are used due to this invention. It is advantageous to make the complementary cell which produces only a single regulator, especially an inducer from the relation of this invention. However, it is also advantageous to have satisfactorily the cell which produces some inducers.

According to the advantageous mode, the complementary cell by this invention is suppleable with in trans by the virus vector by this invention, especially the adenovirus vector. In this relation, the complementary cell for E1 and/or E4 function is chosen advantageously. Therefore, this invention relates also to the cell in which the complementation of the second generation adenovirus vector which has a defect in E1 function and another adenovirus function (an anaphase or first stage) was meant. Such a cell includes all or some of adenovirus fields other than E1 field put under the control of the promotor preferably accompanying [ at least one ] the 5' end for the tetO array of 1-20 which can be activated, all or a part, and the regulatory sequence tTA, for example, the transformer activator, of E1 field of the adenovirus by which a manifestation is controlled by one of promotors. In the advantageous modification, it consists of the minimum promotor of the CMV virus (cytomegalovirus) origin, and the upstream has seven tetO arrays in the direction of a head-taele. It is introduced into the complementary cell by this invention after that simultaneous in shave an inducer before the adenovirus array put under control of a tetO array, or it is added to a culture medium as mentioned above. When an inducer (for example, tTA) is made to discover in a complementary cell and adenovirus gene expression is not desired any longer, it is also possible to add repressor (for example, tetracycline) to a culture medium.

According to the desirable example, adenovirus fields other than E1 field consist of : (i) E4 field especially all or a part of arrays which carry out the code of the latter open reading

frames 6 and 7 (ORF 6/7), or all or a part of arrays which carries out the code of the DBP protein (DNA-binding protein) or the temperature sensitive mutant of (ii) E2 field, especially the latter to instead of.

Though natural, the complementary cell by this invention can include further the third adenovirus field which the manifestation put under control of a suitable element. In this relation, a desirable cell is for [ of the adenovirus vector which has a defect in a comprehensive initial function indispensable to a duplicate ] complementation, includes all or some of E1, E2, and E4 field, and has put it under control of the promoter accompanied by [ on the other hand ] the above regulatory sequences in another side or both sides of two next fields.

One of the advantages of the complementary cell by this invention is that it can produce the infectivity virion of a high potency from an idiomatic virus vector or the virus vector by this invention. The virus titer of last PUREPARESHON (after purification) is  $5 \times 10^{10}$  pfu/more than ml further much more preferably  $5 \times 10^9$  pfu/more than ml preferably absolutely  $1 \times 10^9$  pfu/more than ml  $5 \times 10^8$  pfu/more than ml advantageously. It is understood that vocabulary called pfu is related with the particle which can form a plaque by infection of a permissive cell. The technique for evaluating the number of pfu(s) is customary, and is known by this contractor. An agar technique (Graham and Prevec, 1991, above-shown) is mentioned. Usually, it is less than [ whether virus titer pfu/ml is equal to the actual number of the infectivity virion which can demonstrate a gene transfer function, and it ]. In fact, it cannot increase effectively by the permissive cell and a certain percentage cannot form a dissolution plaque. The potency of the infectivity virion produced in the complementary cell by this invention is  $5 \times 10^{11}$  ifu/more than ml further much more preferably  $5 \times 10^{10}$  ifu/more than ml preferably absolutely  $1 \times 10^{10}$  ifu/more than ml  $5 \times 10^9$  ifu/more than ml advantageously. Vocabulary called ifu is infected with a non-approving target cell, the genome is transferred, and it is understood that it is related with the infectivity particle which can perform gene expression held by the latter.

The number of ifu(s) is estimated by the number of the target cells which discover a target gene or virogene. The technique used when this contractor detects those manifestations: Know about dyeing etc. instead of immunofluorescence and Western blotting. For example, when the target gene consists of a LacZ gene, it is visualized by dyeing by X-Gal (5-BUROMO-4-chloro-3-indolyl beta-D-galactopyranoside), and the number of blue cells counts a protein beta galactosidase. A manifestation product is visualized by Western blotting when a CFTR therapy gene is used. It is also possible to look for the cell which discovers Adenovirus DBP, penton, or fiber protein using a special antibody.

The complementary cell by this invention can make the suitable part and suitable regulator of an adenovirus genome from various cell lineage with the transfection of the DNA fragment which carries out a code. In the network which can be considered, a Homo sapiens system (HeLa, A549 and MRC5, W138 grade) is mentioned instead of a Vero kidney [ which may come to hand for a collection like ATCC (Rockville, USA) ] (ape), BHK

(hamster), MDCK (dog), and MBDK (cow) system, and a CHO system (hamster). However, especially suitable cells are 293 systems. Use of a primary system like a primary Homo sapiens retinal cell is also considered.

The infectivity virion by this invention is produced by the helper virus which is based on KOTORANSUFEKUSHON of the vector to the inside of a suitable cell, and an adenovirus fragment according to an idiomatic technique (Graham and Preveet, 1991, above-shown) in this industry, or supplies a non-functionality virus function by in trans instead. It is [ connection or ] homonous recombination to instead of. It is also possible to consider to make a virus vector from Escherichia coli (E. coli) by in vitro (for example, French Application 94/14470 reference).

This invention: In order that (i) virus vector may obtain the transfected complementary cell It is introduced into the complementary cell which carries out the complementation of the above-mentioned vector by in trans. It is cultivated under conditions suitable in order that the complementary cell by which the (ii) above-mentioned transfection was carried out may perform manifestation of virogene, and production of the above-mentioned infectivity virion. It reaches. (iii) It is related also with the production approach of the infectivity virion containing the virus vector by this invention which consists of the above-mentioned infectivity virions being collected in a cell culture object.

It is collected also from a cell, although infectivity virions are collected from a culture supernatant though natural. According to the advantageous mode, the adenovirus vector and complementary cell by this invention are used. According to another modification, an idiomatic complementary cell is used. It may be the need to add an inducer to a culture medium in case of the case where the regulatory sequence which a manifestation unit can activate is included. It depends on the actual property of an inducer for the amount used. If it is this contractor, according to concrete data, it can adjust to the best concentration clearly. This invention relates also to the production approach of the infectivity virion containing an idiomatic virus vector using the complementary cell by this invention. for example, ORF 6/7 of E4 field under control of the minimum promotor accompanying 5' end for a (i)7 \*\* tetO array and (ii) – oui which has a defect in E1 and E4 function into the 293 cells which discover the transformer activator tTA directed by the same promotor – RUSUBEKU

The virion which is infectivity is producible.

The theme of this invention is related also with the physic constituent which comes to contain the virus vector by this invention, infectivity virion, a complementary cell, or an eukaryon host cell combining the vehicle permitted from a pharmacological viewpoint as a therapy or preventive. Especially the constituent by this invention is. : - genetic defects (a hemophilia, cystic fibrosis, diabetes mellitus or a myopathy, a Duchene's myopathy, Becker's myopathy, etc.)

cancer which is guided by - oncogene or the virus a virus disease like the - hepatitis B or C

and an acquired immunodeficiency syndrome (acquired immune deficiency syndrome which occurs from HIV infection) – and – It is the prevention of a failure like a recurrence virus disease like virus infection or for recovery treatment. [ resulting from - Herpes virus ]

The physico-chemical constituent by this invention is manufactured with a conventional method. Especially, a therapy or the therapy effective dose of preventive is combined with a vehicle like a diluent. The constituent by this invention is a part, the whole body, or aerosol, and is especially prescribed for the patient in intramuscular and a vein in hypodermically and the heart in the stomach according to intraperitoneal, the inside of a neoplasm, lungs, and a nose, or an endotracheal path. Administration is the dosage of one batch or is performed by 1 time or the dosage repeated several times after a certain time interval. A suitable route of administration and dosage change according to various parameters, for example, the individual treated, a failure, or the object gene transfected instead of.

Especially the virion by this invention is 10<sup>4</sup>-10<sup>14</sup>pfu (plaque-forming unit).

A prescription is advantageously written by the dosage of 10<sup>6</sup>-10<sup>11</sup>pfu preferably 10<sup>5</sup> to 10<sup>13</sup> pfu. In the formula, the adjuvant or excipient permitted from a pharmacological viewpoint can also be contained.

This invention relates to the therapy or prevention application of the virus vector by this invention, the infectivity virion, complementary cell, or eukaryon host cell for manufacture of the drugs for therapies of the Homo sapiens by gene therapy, or an animal object preferably at the last. According to the first possibility, drugs are in vivo (for example, at the neoplasm which may reach, an intravenous injection twists for aerosol by the lung). A medicine is directly prescribed for the patient. ex vivo which consists of following the technique of drawing and this industry in cells (a myeloid stem cell, a peripheral blood lymphocyte, muscular cell, etc.) from a patient, transfecting or infecting them in vitro, and re-medicating a patient with them. It is also possible to adopt approach. When the manifestation unit includes the regulator array which answers repressor, in order to prevent or restrict the manifestation of viro-gene, it is possible to prescribe repressor for the patient (beforehand [ of repressor ], coincidence, ex post facto administration, or coincidence manifestation by the idiomatic vector).

This invention also attains to the therapy approach, and according to it, the patient who requires such a therapy is medicated with the therapy effective dose of the virus vector by this invention, virion, an eukaryon host cell, or a complementary cell.

This invention refers to the following drawing and the following example, and is indicated in more detail.

Drawing 1 is the schematic diagram of a human adenovirus (expressed per arbitration of 0-100) type 5 genome, and shows the location of a different gene.

Drawing 2 is the schematic diagram of a vector pTG4673 which can perform the compositionality manifestation of the pac (puromycin resistance) selector genes under tTA directed by the CMV promoter (pCMV) and control of an SV40 promoter.

Drawing 3 is the schematic diagram of the human adenovirus vector pTG4696 containing

the cassette for a manifestation of ORF 6 and 7 of E4 field which can be activated by tTA. Drawing 4 is the schematic diagram of the vector pTG8343 containing the part of 5' end of adenovirus 5 genome.

Drawing 5 is the schematic diagram of the first generation recombination adenovirus vector and a vector pTG4662 with which most E1 and E3 fields were lost. A recombination cassette consists of the bacteria LacZ gene and SV40 virus polyadenylation signal (pA) which carry out the code of the beta galactosidase to an adenovirus MLP promotor (Ad2) after that.

Drawing 6 is the adenovirus vector by which most E1, and E3 fields were lost, and is the schematic diagram containing the cassette for the compositionality manifestation of tTA of a vector pTG4682.

Drawing 7 is the adenovirus vector by which most E1, E3, and E4 fields were lost, and is the schematic diagram containing the cassette for the compositionality manifestation of tTA of a vector pTG4683.

Drawing 8 is the schematic diagram of a vector pTG4675 which can perform the inductive manifestation of tTA (under control of the CMV minimum promotor (-53+1) with whom it was preceded by seven copies of the tetO array indicated to be tetO-CMV<sub>i</sub> by a diagram).

Drawing 9 is the adenovirus vector by which most E1 and E3 fields were lost, and is the schematic diagram containing the cassette for the inductive manifestation of tTA of a vector pTG4684.

Drawing 10 is the adenovirus vector by which most E1, E3, and E4 fields were lost, and is the schematic diagram containing the cassette for the inductive manifestation of tTA of a vector pTG4685.

Drawing 11 is the schematic diagram of a vector pTG5606 which can discover the pac selector genes which give ORF 6/7 and tTA, and puromycin resistance of adenovirus E4 field under control of the CMV minimum promotor with whom it was preceded by seven copies of a tetO array.

Drawing 12 is western blotting analysis of a manifestation of the DBP protein in 293 cells which it was temporarily transfected by the vector pTG9579, and were cultivated by (-) (+) and under absent under existence of a tetracycline.

Example This invention attaches the following example like 1 voice, and it is explained.

The following construction According to the gene engineering explained in full detail by Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), and the general technique of molecular cloning, when a commercial kit is used, it carries out according to explanation of a manufacturer. Cloning process using a bacterial plasmid E.coli It carries out by stock 5K (Hubacek and Glover, 1970, J.Mol.Biol., 50,111-127) or BJ5183 (Hanahan, 1983, J.Mol.Biol., 166,557-580). The latter stock is preferentially used at a homonous recombination process. The PCR magnification technique is known by this contractor (for example, refer to PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, Innis, Gelfand, Sninsky and White ed, and Academic

Press Inc.). The technique used for restoration of a limit part is E.coli. It consists of filling 5' cohesive end using the large fragment of DNA polymerase I (Klenow).

A cell is made to transfect this contractor about cell biology relation according to a well-known standard technique. Although a calcium phosphate technique (Maniatis et al., above-shown) is mentioned, the protocol besides either [ like ] which is a DEAE-dextran technique, electroporation, the approach based on an osmotic shock, a microinjection, or an approach based on use of liposome may also be used. The culture condition is idiomatic about those fields.

Ad5 genome for which the following cell lineage is used in the following example: (it ITR(s) 5' →) Are obtained from the nest to the chromosome of 5' end of an en KYAPUSHIDESHON array and E1 field. 293 systems Ad5 of the Homo sapiens germ kidney origin (Graham et al., 1977, above-shown) (it can obtain from ATCC in a reference CRL1573) The cassette for a manifestation of E4 field (nt32800-35826) and pac selector genes TG1653 system originating in 293 systems by which the transformation was stably carried out by the held plasmid pTG1653 (indicated by the international application WO 94/28152 and the example 8)

It should be understood that other cell lineage may be used.

Furthermore, the adenovirus genome fragment used by the construction from which the following differs is correctly shown by the nucleotide sequence of Ad5 genome which is indicated in the reference M73260 in the Genebank data bank about those locations.

Example 1: complementation system which discovers the inducer which can activate adenovirus gene expression the complementation system of the 293 system origin which can discover (1) trans-activity-ized protein tTA in configuration in this example, and a part of (2) E4 field – construction of the adenovirus vector put under control of the tetO array to which virogene answers tTA is indicated. Although virion is formed after the transfection of the vector to the inside of the system, the reason is that the transformer complementation of the E1 and E4 function is carried out by supply of adenovirus E1 field and the manifestation product of tTA. In the infection host cell which does not produce chimera tTA protein by nature, as as a result as E4, the manifestation of anaphase protein (E4 dependency manifestation) decreases remarkably, and, thereby, restricts the problem of cellular immunity and inflammation.

1. Construction of complementation system which discovers transformer activator tTA The vector pTG6529 which can choose a transformed cell by the puromycin is built first. The vector is obtained from cloning to the inside of p Pori III-I\* (Lathe et al., 1987, and Gene 57,193-201) of an SV40 promotor and a pac gene, and the manifestation cassette that consists of SV40 virus poly A signals after that. Such construction belongs in this contractor's capacity, in view of the correspondence array indicated by reference (Morgenstern and Land, 1990, Nucleic Acid Res.18, 3587-3596; Genebank reference JO2400).

In parallel, Enzymes Sspl and Hpal cut a vector pUHD 15-1 (Gossen and Bujard, 1992,

above-shown). At least the said division of pTG6529 carries out cloning of the fragment including the array which carries out the code of the tTA with which it is preceded by the CMV promotor in between, and pTG4673 is obtained ( drawing 2 ).

A vector pTG4673 is transfected into 293 cells with a conventional method. Though it was natural, it was possible to also have made the vector for a manifestation and selection vector (for example, pUHD 15-1 and pTG6529) of tTA transfect. A cell is cultivated by the selective medium (puromycin 1microg/ml) after transfection. The resistance clone of 80 was isolated and the manifestation examined about 35 the marker gene controlled according to a tetO array about those trans-activity-ized capacity among these. The luciferase gene was chosen from the reason of the simplicity of operation, and the sensibility of assay.

The reporter vector pUHC 13-3 (Gossen and Bujard, 1992, above-shown) which put luciferase under control of the CMV minimum promotor preceded with the array which carries out a code by seven copies of tetO is used. Temporary transfection to the inside of the clone examined performs a trial. Two days after and luciferase activity are Promega. A scintillation counter (LS5000TD, Beckman) is used for measurement of a sample, and it is estimated as a commercial kit ("Luciferase Assay System") with a cell extract. The assay shows producing the functional tTA product which can activate the gene expression which it turned out to be a positivity about ten among the evaluated clones, and they have recognized the tetO array, and was put under those control.

2. Construction of adenovirus which E4 gene expression can guide by tTA As mentioned above, the gene expression which carries out the code of ORF 6 and 7 of E4 field is enough, when performing virus replication without the need for the complementation. This example has indicated construction of the adenovirus vector by which a part of E1 and E3 field and E4 field were lost except for the array whose manifestation carries out the code of ORF 6 and 7 by which it is promoted under existence of tTA as a result under control of tetO.

A vector pUHD 10-3 is obtained from cloning to the inside of the plasmid pBR322 of the XhoI-EcoRI fragment which held seven tetO copies and the CMV minimum promoters (at least the imprint initiation section is received and they are -53 place; Gossen and Bujard, 1992, and the above-shown). The BglII-BamHI fragment which held the array which is acquired from pTG1653 by BamHI after cutting (part located in the lower stream of a river of promoterregion), and carries out the code of ORF 6 and 7 is inserted, and pTG4658 is obtained.

A vector pTG4664 is obtained from cloning of the KpnI-HpaI adenovirus fragment (nucleotide 25838-32004) of a between [ the KpnI-SmaI parts in Pori / II (Lathe et al., 1987, above-shown) / p where the BglII part was removed beforehand ]. Subsequently, the great portion of E3 (nucleotide 27871-30748) is removed by enzyme cutting (HpaI-Hind III).

The XhoI-HpaI fragment which held the cassette for an accommodation manifestation of ORF 6 and 7 is isolated from pTG4658, it inserts after an operation of a Klenow fragment into the vector pTG4664 which was cut by BglII and processed in the Klenow fragment, and

pTG4668 and pTG4669 are obtained according to the direction of a cassette. The latter is introduced into an adenovirus vector by homonous recombination. The recombination (indicated by example 4 of the; international application WO 94/28152 by which E1 and E4 indispensable to duplicate field and un-indispensable E3 field are lost from there (deletion of nucleotide 27871-30748)) vector pTG4663 originating in the second generation vector by which cloning was carried out is used for this purpose instead of a "MLP promotor-LacZ gene SV40 pA" manifestation cassette being E1 field. E. Carry out joint transformation of the coli cell by the virus vector pTG4663 by which linearization was carried out to pTG4668 or pTG4669 by which cleavage was carried out by Hind III by SpeI, and obtain pTG4696 ( drawing 3 ) and pTG4697.

Other similar type adenovirus vectors are producible. For example, it is possible to consider the gene of E2 field to be also Lycium chinense under control of a tetO array.

If it is this contractor, although isolated from the vector pUHD 10-3, the array which is made to replace E2 promotor by the promotor [ like ] who can adjust, or is in the upstream of E2 promotor's TATA box would be made to remove, and it will be well versed in the molecular biology technique of making one or more (preferably seven) copies of a tetO array introduce into those locations. For example, it is also possible to build the vector adjusted on some level by insertion of tetO in the upstream of the TATA box of the promotor who directs the manifestation of the virogene of E2, E4, and/or MLP.

3. Production of virion In the virus vectors pTG4696 or pTG4697, one of the clones of 10 which produces tTA of Example 1 is transfected. The cell can carry out the complementation of the E1 function, and can produce tTA in which moreover activate the manifestation of ORF 6 and 7, and virion is made to form. Subsequently, the stock with which a target cell can be infected in specific m.o.i. (multiplicity of infection) which changes variously by 0.1-100 is made.

Example 2: it is construction of the complementation system 4677 for E1 and E4 function, and the manifestation of E4 can be guided by tTA In this example, it is related with the complementation system produced from the transfection of 293 cells by the vector for ORF6 of E4 put under control of the minimum promotor with whom it was preceded by seven copies of tetO, and the manifestation of seven. The transfected cell can reach E1 function in configuration, and can carry out the complementation of the E4 function by tTA induction. A defective adenovirus vector or an idiomatic expression vector may be made to hold the latter.

1. Construction of complementation system The XhoI-BamHI fragment (a "tetO-CMV minimum promotor-ORF 6 and 7" cassette is held) of pTG4658 is inserted between Sall of the selection vector pTG6529, and a BglII part, and pTG4677 is obtained. The resistance clone of 60 was obtained after the transfection to 293 systems, and puromycin selection. The clone which shows the best capacity about the complementation may be investigated by different technique.

The plasmid pUHD 15-1 which discovers tTA in configuration is made to transfect

temporarily in a primary method. Western blotting analysis of the cell extract using a suitable antibody can estimate those capacity that carries out the transformer complementation of the E4 adenovirus function to the amount of ORF6 produced in these clones, and/or seven polypeptides if it pulls. According to another approach, the defective adenovirus which discovers tTA may also be used. This approach is explained in full detail below.

2. Construction of defective adenovirus which discovers tTA in configuration Two series was built. pTG4682 which was equivalent to the adenovirus genome by which most E1 and E3 fields were lost, and contained the cassette for the configuration-manifestation of tTA (CMV promotor) instead of E1 field. In addition, deletion of the E4 field is carried out from pTG4683.

Starting material is the vector pTG8343 obtained from insertion all over the part 1-458' of 5' end of an adenovirus genome, i.e., a nucleotide, and Pori [ II (Lathe et al., 1987, above-shown) ] p of an array covering 3328-5788 ( drawing 4 ).

A vector is combined with the SspI-HpaI fragment of pUHD 15-1 which held the tTA array after that with the CMV promotor after processing [ cutting of pTG8343 by BglII, and ] in a Klenow fragment. pTG4674 for inserting the tTA cassette by the homonous recombination by the adenovirus vector which held the homonous array is obtained. The cassette for LacZ gene expression and the vector pTG4662 ( drawing 5 ) including the remaining adenovirus array (a nucleotide 3329-27870 and 30749-35935) in which E3 field was lost are chosen from this purpose instead of 5'ITR and the en KYAPUSHIDESHON array (nt1-458) of Ad5, and E1 field.

E. Carry out joint transformation of the coli stock BJ by the vector pTG4662 by which linearization was carried out by ClaI, and pTG4674 by which cleavage was carried out by SgrAI and BstEII, and obtain pTG4682 ( drawing 6 ). By this homonous recombination phenomenon, exchange to the tTA cassette held from the LacZ cassette of pTG4662 with the fragment obtained from pTG4674 is performed.

A vector pTG4683 ( drawing 7 ) can follow the same technique by in vitro homonous recombination between pTG(s)4674 cut by pTG4663, SgrAI, and BstEII by which cleavage was carried out by ClaI. The vector pTG4663 is the same as that of pTG4662 except for the fact that most E4 fields (nucleotide 32994-34998) are lost.

3. Construction of defective adenovirus which discovers tTA inductively In order to act as the monitor of the manifestation of a tTA array, the CMV minimum promotor who makes a system self-induction nature and who included seven copies of a tetO array in 5' end is used. In fact, production of some tTA molecules of a non-guided promotor activates the system. or [ as mentioned above, / that E4 field was lost ] – or two adenovirus vectors pTG4684 and pTG4685 which are not lost are produced.

The CMV promotor of pUHD 15-1 is exchanged for the homologue which was isolated from pUHD 10-3 in the form of a XhoI-EcoRI fragment and which can be prepared. pTG4659 is obtained. The cassette is isolated from the latter by SspI and HpaI cutting, cloning is carried

out into the vector pTG8343 by which linearization was carried out by BglII, it processes in a Klenow fragment, and pTG4675 is obtained ( drawing 8 ). Subsequently, joint transformation of the E.coli stock BJ is carried out by pTG4662 or pTG4663 by which linearization was carried out to the above-mentioned vector processed by SgrAI and BstEII with Enzyme ClaI, and the virus vectors pTG4684 ( drawing 9 ) and pTG4685 ( drawing 10 ) are obtained by homonous recombination.

Virion may be obtained with the easy transfection of suitable cell lineage like [ in the case of Example 2.1 ] under [ of a tetracycline ] absent (addition of the antibiotic to the culture medium which has the inhibition effectiveness in the imprint of tTR and ORF 6 and 7 which can be adjusted according to a tetO array).

4. Micro infection and functional trial of micro titration An experiment is conducted in parallel in 1653 cells with which 293 cells, E1, and E4 function to compensate E1 function is compensated. A cell is made to distribute to a culture plate with the base of abbreviation 5x10<sup>4</sup> cell / well. Subsequently, it is made to transfect by the vector 4682-pTG 4685 which has them examined. Both cell types estimate those (based on those incidence) capacity that forms a plaque, and those sizes. As control, although it carries out considerable to the first generation adenovirus vector (deletion of E1 and E3), and a second generation adenovirus vector (additional deletion of E4) respectively, it is discovered, tTA is twisted and rearranged and vectors pTG4662 and pTG4663 are used.

Generation of virion can be easily detected by both cell lineage from pTG4662 (formation of a big plaque appears quickly). pTG4663 gives the small plaque which can be proliferated only in 1653 cells with which E1 and E4 are compensated about the field, and appears later. About vectors pTG4682 and pTG4684, those transfection to the inside of 293 and 1653 cells and formation of the subsequent big plaque which can be identified easily are prompt (behavior similar to pTG4662 control).

The vectors pTG4683 and pTG4685 by which E4 field was lost show the behavior which was equal to pTG4663, and although virion appears slowly and forms the plaque of small size in case of 1653 systems, a plaque is not detected in case of 293 systems.

It seems that it is shown that is not [ these data ] disadvantageous for virus multiplication, or it is not harmful to cell proliferation. [ of a manifestation of tTA ]

As mentioned above, this technique may be applied to the system (293/pTG4673) and vectors pTG4696 and pTG4697 of Example 1.

Example 3: it is construction of the complementation system 5606 about E1 and E4 function, and the manifestation of E4 can be guided by tTA produced by the system In this example The CMV minimum promotor (at least the imprint initiation section is received - the 53rd place) accompanying 5' end for seven continuous tetO arrays deserves. Are obtained by the transfection of 293 cells in the vector pTG5606 which held the array which carries out the code of ORF 6/7 put under control of the promotor called pCMV\* below, and the tTA in addition to pac selector genes. The complementary cell lineage which can perform growth of E1- and E4-defective adenovirus is indicated. By this self-induction system, it acts

positively in a tetO array and production of some tTA molecules of the minimum CMV promoter who can make composition of these very thing and composition of ORF6/7 product amplify in amount sufficient for the effective complementation of a defective vector is enabled in the first place first.

1. Construction of plasmid pTG5606 Although a vector pTG4688 is built at the first process, this is obtained from cloning to the inside of the vector pTG4677 (Example 2.1) cut with these enzymes of these of the cassette (a CMV promoter / enhancer-tTA) refined from pTG4673 (Example 1.1) by which cleavage was carried out by HpaI and PvuI. A vector pTG5606 is obtained from the above-mentioned vector by the permutation of the CMV promoter / enhancer by promoter pCMV\* which can be adjusted. For this reason, after carrying out linearization of the pTG4688 by enzyme Scal-XbaI, the Scal-XbaI fragment which holds pCMV\* isolated from pTG4659 is inserted. In this way, the produced plasmid pTG5606 ( drawing 11) contains the three following manifestation cassettes. : pCMV\* promoter, The first cassette which consists of the arrays and SV40 virus poly A arrays which carry out the code of the tTA transformer activator, the second cassette which consists of the puromycin resistance genes (pac gene) and SV40 virus pA arrays under control of the initial promoter of – and – With a pCMV\* promoter Adenovirus 5 accompanied by the poly A signal of self after that The third cassette which consists of arrays which carry out the code of ORF 6/7.

2. Production of complementation system 5606 4x106293 cells (ATCC CRL1573) are cultivated by the DMEM culture medium (Dulbecco alteration Eagle culture medium) under existence of 10%FCS. About 70 to 80% at the rate of confluence, they are distributed to some pans, and it transfects in the plasmid pTG5606 of after that 10microg or 20microg (Gibco-BRL transfection kit; reference 530-8120SA). A cell is cultivated 48 hours after by the selective medium (the first week is 1microg/ml puromycin 0.7microg/ml and after that). A resistance clone is made to amplify under existence of a tetracycline suitably by the above-mentioned selective medium.

The latter demonstrates the repressor effectiveness in a tetO array, the purpose which adds it is decreasing composition of the manifestation product of ORF 6/7, it has cytotoxicity, and cell death may be drawn. For this reason, three batches were respectively made according to the tetracycline concentration contained in the culture medium by ml in 0microg [ ml ] /, 1microg [ ml ] /, and 5microg / . It appears irrespective of the amount and culture condition of DNA by which many clones were transfected.

The clone which carries out the coincidence manifestation of the E1 and E4 gene was screened with micro infection and a micro titration technique. 5606 clones of about 100 are infected in low moi (multiplicity of infection) by the E1-E4 defective adenovirus vector (for example, international application WO94/28152 reference). A cytopathogenic effect is observed 48 - 72 hours after infection about those 10 - 16% according to the batch with which they were obtained. A cytopathogenic effect is the proof of growth of a duplex defective virus, and is reflecting the capacity of the clone about the transformer

complementation. A microwell titration technique estimates the potency of infectivity virion by the permissive cell. For this reason, freezing-defrosting of 3 cycles recovers virion from an infection culture, serial dilution of the virus supernatant to titrate is carried out with the base of 100 microl / well, and  $4 \times 10^4$  1653 cells are made to contact. A different dilution scale factor estimates virus titer roughly by observation of a cytopathogenic effect. 5606 most productive clones (it is a cytopathogenic effect at a high dilution scale factor) are chosen by pfu/ml and ifu/ml for still more exact research of yield.

You cultivate 5606 selected clones ( $5 \times 10^5$  cells), and make it again infected by the E1-E4 adenovirus vector. For example, it is possible for E1, E3 (nt28592-30470), and E4 (nt32994-34998) field to be lost, and to use the vectors AdTG8595 and AdTG4651 which contained respectively the cassette for object gene expression, the MLP-LacZ promotor, and the MLP-CFTR gene promotor instead of E1. As mentioned above, virus supernatants are collected, a permissive cell (a system 1653 or 5606 production clone) is infected in the virus supernatant of a suitable dilution scale factor, and a potency pfu/ml is investigated by counting a dissolution plaque in an agar. # Two clones called 5-19/1, and #5-38 show an one to  $5 \times 10^9$  pfu/ml potency (titration is performed by these very thing). The yield (ifu/ml) of an infectivity particle is evaluated by counting the infected cell which discovers an object gene. For this reason, the virus supernatant obtained from 5606 clones infected in AdTG8595 is titrated by these very thing, an adherent cell is fixed 48 hours after infection (PBS buffer solution which contained formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde 2%), and production of a beta galactosidase is made to visualize by coloring matter X-Gal (for it to be 1mg/ml among the PBS buffer solution with which the 5mM ferricyanide K, the 5mM ferrocyanide K, and 2mM(s)  $MgCl_2$  were added). The obtained potencies are 1010 and 1011 ifu(s)/ml.

Finally, a disadvantage crack, the manifestation of anaphase virogene is because it may produce the defect of the assembly of virion, although it is checked that there is nothing. Production of a fiber and penton investigates by Western blotting about the pellet of the infected cell collected after the cycle of freezing-defrosting. Some of antibodies (Henry et al., 1994, J.Virol.68, 5239-5246) to a fiber or antibodies (Boulanger et al., 1973, Eur.J.Biochem.39, 37-42) to a penton base, and cell extracts that are equivalent to the protein of 3microg using a peroxidase-labeling anti-rabbit antibody (Amersham, NA 934) after that perform analysis according to a standard technique. Visualization is performed using an ECL detection kit (Amersham, RPN 2106). By the data, when E1-E4 adenovirus obtained from two clones [ 5606 ] is obtained in 293 cells infected by the E1-virus, it is shown that anaphase protein can be produced on near level.

As a conclusion, 5606 clone #5-19/1, and #5-38 are E1 and E4 complementation systems which can make a duplex defective vector amplify with the potency exceeding  $1 \times 10^9$  pfu/ml, and the potency which is equal to large-scale production.

Example 4: it is construction of the complementation system 9579 about E1 and an E2A function, the manifestation of E2A can be guided by tTA, and the latter is produced by that

system. This example has indicated the complementary cell lineage which can perform growth of E1- [ which is obtained by the transfection of 293 cells in the vector pTG9579 which performs the self-induction nature manifestation of DBP protein according to the same principle as a precedent ], and E2A-defective adenovirus.

1. Construction of vector pTG9579 A vector pTG9579 is built as follows. : 3' end of adenovirus 5 genome is isolated from production of the genomic DNA cut by *DraI*-*BsmBI*. Subcloning of the corresponding fragment is carried out all over the *SmaI* part of a vector pUC19 (Gibco BRL), and the middle vector pTG9568 is obtained. It turns out that the halt codon of a DBP array has broken in *DraI* cleavage. It is restored by *EcoRV* of pTG9568 of genome mold and a fragment including the right array acquired from the suitable primer by PCR magnification, and installation between *BamHI* parts. pTG9571 is obtained.

The cassette for a manifestation and SV40 of a neo gene (Colbere-Garapin et al., 1981, J.Mol.Biol., 150, 1-14) which carry out linearization of the vector pUHD 10-3 by *Hind III*, process in a Klenow fragment independently, and are directed by the initial promotor pA signal is inserted. In this way, after carrying out linearization of the obtained vector pTG9555 by *XbaI* and giving an operation of a Klenow fragment after that, cloning of the fragment which held the DBP array isolated from pTG9571 after processing in the cleavage and the Klenow fragment in *XhoI* and *EcoRI* is carried out. The *HpaI*-*XhoI* fragment (Klenow) finally isolated from pTG4659 which held the cassette for tTA gene expression is introduced all over the *XhoI* part processed in the Klenow fragment of the vector pTG9577 made from the previous process. if it summarizes – latter: The array which carries out the code of the tTA transformer activator after that to a pCMV \* promotor, and an SV40 virus the first cassette which consists of poly-A arrays, and the second cassette which consist of the antibiotic G418 resistance neo genes and the SV40 virus pA arrays under control of an initial promotor – and – The third cassette which consists of the arrays and the SV40 virus pA arrays which carry out the code of the adenovirus 5DBP protein under control of a pCMV\* promotor be included.

Production of the functional DBP protein by pTG9579 may be checked with temporary transfection to the inside of 293 cells. If it says simply, it will transfect by the vector of 5microg by the calcium phosphate method, and 1x10<sup>6</sup> cells will be cultivated after that under existence (1microg/(ml)) of a tetracycline or under absent. Cells are collected four days after transfection, a cell pellet is processed with the dissolution buffer solution (50mM Tris-HCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 5mM KCl, 150mM NaCl, and 1% Triton X-100) of 100microl, and protein is dissolved. 7micro of protein extracts I is dissolved in the 5%beta-mercaptoethanol content Tris-glycine addition buffer solution, and PAGE electrophoresis is given 8 to 16% under denaturation conditions. Adenovirus DBP protein is made to use and visualize DBP protein for a specific antibody (Reich et al., 1983, Virology, and 128,480-484;, for example, mouse monoclonal antibody alpha72KB6-8) and a peroxidase-labeling sheep anti-mouse immunoglobulin antibody (Amersham;NA 931) by Western blotting, after transferring to a nitrocellulose membrane. An ECL kit (Amersham,

RPN 2106) performs visualization. The result shown by drawing 12, shows that it is produced in 293 cells by which DBP protein was temporarily transfected by the vector pTG9579 from a manifestation decreasing under existence of a tetracycline, adjusting.

2. Production of complementation system 9579  $3 \times 10^6$  293 cells are transfected using the plasmid pTG9579 of 20 microg (Gibco-BRL transfection kit; reference 530-8120SA). It is a clone G418 It chooses under 600 microg [ // ml ] and tetracycline 1 microg/ml existence, and examines about those capacity to make DBP protein produce with the above-mentioned Western-blotting technique. Among those, 20%, when obtained by gmDBP6 system under existence of dexamethasone, DBP of an amount detectable on near level is discovered, and two are called #7-44 and #7-32 among those. The latter system is a reference system for the complementation of an E2A function (Brough et al., 1992, Virol.190,624-634). It originates in the HeLa cell transfected by the manifestation cassette including the array which carries out the code of the DBP directed by the dexamethasone inductivity MMTV promotor.

You cultivate a DBP positivity clone and make it infected in  $\text{moi} \geq 1$  by adenovirus H5d1802 which have a defect in an E2A function (Rice and Klessig, 1985, J.Virol.56,767-778). Two days after infection, serial dilution of the virus supernatant is collected and carried out after the dissolution of the cell by the continuation cycle of freezing-defrosting, and it titrates by the permission system gmDBP6. Existence of virion is observed by the supernatant obtained from clone #7-44 and #7-32, and shows those capacity to compensate an E2A function. It experiments in the same type by the vector pTG9542 (E1- (LacZ), E2A-, and E3-). An infectivity particle is produced and these two clones show that a duplex defective vector is made to increase and amplify, and it gets. Furthermore, since it cannot increase by 293 systems, these particles can check the absence of E2A-phenotype and the revertant. In the magnification experiment conducted by clone #7-44 infected by AdTG9542 virus, when titration was performed four days after infection, one about 125 times the amplification factor of this was shown.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**